

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3048289号

(P 3 0 4 8 2 8 9)

(45)発行日 平成12年 6 月 5 日(2000.6.5)

(24)登録日 平成12年 3 月 24 日(2000.3.24)

(51)Int.Cl.⁷

A61L 27/00

識別記号

F I

A61L 27/00

V

G

J

請求項の数 4 (全32頁)

(21)出願番号 特願平5-101520

(22)出願日 平成 5 年 4 月 27 日(1993.4.27)

(65)公開番号 特開平6-304242

(43)公開日 平成 6 年 11 月 1 日(1994.11.1)

審査請求日 平成 8 年 7 月 22 日(1996.7.22)

審判番号 平11-980

審判請求日 平成11年 1 月 13 日(1999.1.13)

(73)特許権者 000190943

新田ゼラチン株式会社

大阪市浪速区桜川 4 丁目 4 番 26 号

(72)発明者 南川 和彦

大阪府八尾市二俣 2 丁目 22 番地 新田ゼ
ラチン株式会社大阪工場内

(72)発明者 小林 昶運

大阪府八尾市二俣 2 丁目 22 番地 新田ゼ
ラチン株式会社大阪工場内

(74)代理人 100073461

弁理士 松本 武彦

合議体

審判長 吉村 康男

審判官 深津 弘

審判官 内藤 伸一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コラーゲン-リン酸カルシウム複合材料およびその用途

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コラーゲンを含む複合材料であって、リン酸四カルシウムおよびリン酸八カルシウムからなる群から選ばれる少なくとも 1 種の化学活性を有するリン酸カルシウム化合物とリン酸イオン源とが配合されてなることを特徴とするコラーゲン-リン酸カルシウム複合材料。

【請求項 2】 コラーゲンと化学活性を有するリン酸カルシウム化合物の重量比が、コラーゲン：リン酸カルシウム化合物=99.9：0.1～0.7：99.3である請求項 1 記載のコラーゲン-リン酸カルシウム複合材料。

【請求項 3】 ポリフェノール系の架橋剤が配合されてなる請求項 1 または 2 記載のコラーゲン-リン酸カルシウム複合材料。

2

【請求項 4】 請求項 1 から 3 までのいずれかに記載の複合材料に、ゼラチンおよびレゾルシノールが添加されてなる生体用接着剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、歯周組織における組織再生膜 (GTR 膜)、止血剤、骨補填材、軟骨補填材、硬組織細胞の三次元培養基材等として用いるコラーゲン-リン酸カルシウム複合材料およびその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、GTR 膜や骨補填材として、コラーゲンをポリフェノール系の架橋剤で架橋させた材料 (たとえば、コラーゲン膜等) が用いられている。これらの材料は、コラーゲンが生体に由来するため、生体親

和性や柔軟性に優れている。しかし、この材料は、組織や骨の修復を促進することはできなかった。

【0003】また、従来コラーゲン膜、綿状物あるいはフィブリン糊が止血剤として使用されているが、特に硬組織では、その止血効果およびその後の硬組織修復が不十分であった。一方、 α -リン酸三カルシウム（以下、 α -TCPと記す）、リン酸四カルシウム（以下、TeCPと記す）、リン酸八カルシウム（以下、OCPと記す）等の化学活性を有するリン酸カルシウム化合物は、たとえば、生体内や口腔内において、生体硬組織の主成分であるハイドロキシアパタイト（以下、HApと記す）、炭酸アパタイト（以下、 CO_3 -Apと記す）へ徐々に転化し、生体硬組織と一体化し得るものである。しかし、化学活性を有するリン酸カルシウム化合物のみでは、柔軟性に乏しく成型が困難であり、患部への適切な補填が難しいうえ、止血効果もない。

【0004】そこで、コラーゲンを主原料として用いた材料に、上記化学活性を有するリン酸カルシウム化合物を化学的に結合させれば、柔軟性や成型性がある、組織や骨の修復を促進できるコラーゲン材料を得ることができる。ところで、生体用接着剤としては、フィブリン糊、ゼラチン-レゾルシノール-ホルムアルデヒド接着剤（GRF）等があった。しかしながら、フィブリン糊は、生体親和性は高いが接着性が弱い。一方、GRF接着剤は、接着性は強いが生体親和性が低く、患部の炎症や細胞の塊死を引き起こすこともあった。

【0005】上記の、コラーゲンを主原料として用いた材料に、化学活性を有するリン酸カルシウム化合物を化学的に結合させた材料は、止血剤、生体用接着剤としての用途にも好適である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】したがって、この発明は、コラーゲンを含む材料にリン酸カルシウムが化学的に複合化されることが可能であり、生体への親和性および柔軟性と骨・組織修復機能とを兼ね備えた複合材料およびその用途を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するため、この発明にかかるコラーゲン-リン酸カルシウム複合材料は、コラーゲンを含む複合材料であって、化学活性を有するリン酸カルシウム化合物とリン酸イオン源が配合されてなることを特徴とする。この発明に用いられるコラーゲンとしては、特に限定はされないが、アテロコラーゲンをを用いるのが好ましい。アテロコラーゲンは、酵素処理により分子末端のテロペプチドが一部または全部除去されているコラーゲンであり、生体為害性を持たないものである。コラーゲンは、溶液として用いてもよいし、粉末状態で用いてもよい。

【0008】コラーゲン溶液のコラーゲン濃度は、0.2～2.0%の範囲が好ましい。この範囲を上回ると粘

度が高すぎて溶液としての提供が困難となり、下回ると希薄すぎてコラーゲンの持つ効果が発揮されない。コラーゲンを粉末状態で用いる場合には、平均粒子径が $32\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $10\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。平均粒子径が大きくなると、反応溶液中への溶解が困難となり、コラーゲンの均一分散が不可能となる。

【0009】この発明では、リン酸イオン源が配合される。これは、通常、水溶液の形で加えられる。リン酸イオン源は、複合化の際に化学活性を有するリン酸カルシウム化合物の結晶成長を助け、OCP、Ca欠損HAp、 CO_3 -Apの生成を促進する。リン酸イオンの供給源としては、第一リン酸カリウム、第二リン酸ナトリウム等が挙げられる。水溶液中のリン酸イオンのモル濃度は、 $2/1 \sim 1/30\text{M}$ が好ましい。この範囲より低濃度だと、前述の通りリン酸カルシウムの結晶成長が遅延し、高濃度だと、第一リン酸カリウム、第二リン酸ナトリウム等が溶解せずに析出沈殿する。また、リン酸イオンを含有する緩衝液や培養液（たとえば、MEM培地溶液、BGJ-b培地溶液等）を加えてもよい。

【0010】この発明に用いられる化学活性を有するリン酸カルシウム化合物としては、 α -リン酸三カルシウム（以下、 α -TCPと記す）、リン酸四カルシウム（以下、TeCPと記す）、リン酸八カルシウム（以下、OCPと記す）等が挙げられる。上記化学活性を有するリン酸カルシウム化合物は、単独で用いても2種以上を併用してもよい。これらは粉末状態で用いるとよい。使用量は、乾燥後の複合材料中の重量比が、コラーゲン：リン酸カルシウム化合物=99.9：0.1～0.7：99.3であることが好ましい。リン酸カルシウム化合物量がこれを上回れば、コラーゲンとの良好な複合化が行われぬ。

【0011】この発明では、さらに、ポリフェノール系の架橋剤を配合してもよい。コラーゲンは、架橋剤によって架橋される。架橋剤としてはポリフェノール系の架橋剤が望ましく、特に、タンニン酸、リグニン等が好ましい。タンニン酸やリグニンは、生体関連物質であり、生体為害性を持たないからである。架橋剤の使用量は、コラーゲンに対して0.05～5%が好ましい。この範囲を上回れば、部分的に強く架橋されて逆にコラーゲンのゲル化を阻害する可能性がある。

【0012】この発明では、必要に応じてはアスコルビン酸を添加してもよい。アスコルビン酸は生体内でビタミンC作用を示し、コラーゲンの合成を活性化して細胞増殖を促進する。その他、この発明の複合材料には、テトラサイクリン等の抗生物質、シスプラチン等の抗癌剤、b-FGF、TGF- β スーパーファミリーおよびそれらのDNAあるいは細胞増殖因子や生理活性因子等を添加してもよい。

【0013】この発明の複合材料は、上記の成分を反応させた複合物を乾燥させて得られる。エタノール等の生

体に無害な溶媒を用いて風乾させるか、凍結乾燥させてもよい。また、この発明にかかる生体用接着剤は、請求項1記載の複合材料に、ゼラチンおよびレゾルシノールが添加されてなる。

【0014】ゼラチンを添加することにより、硬化後の強度を高めることができる。また、ゼラチンのカルボキシル基がアパタイトに付いて、バイオポリマー複合化炭酸アパタイト（以下、単に $\text{CO}_3\text{-Ap}$ と記す）が生成することができる。この $\text{CO}_3\text{-Ap}$ は、生体組織と完全に置きかわることができる。この発明に用いられるゼラチンとしては、局方ゼラチン、ゼラチン21（新田ゼラチン社製）等が挙げられるが、バイロジェンフリーゼラチンが特に好ましい。バイロジェンフリーゼラチンは、生体への為害性が少ないからである。ここで、バイロジェンフリーゼラチンとは、細菌の内毒素（高分子リポポリサッカライド）等の発熱物質を除去したゼラチンである。バイロジェンフリーゼラチンは、たとえば、ゼラチンの原料であるオセインまたは獣皮をアルカリ処理してバイロジェンフリー水で洗浄した後、ゼラチンを抽出する方法（米国特許第4374063号参照）、ゼラチンを加水分解した後、限外濾過膜を透過させてバイロジェンを濾別除去する方法（特開昭56-68607号公報参照）等によって得ることができる。

【0015】上述のゼラチンは、そのまま、粉末状態で添加してもよく、溶液として使用してもよい。添加量は特に限定されない。この発明において、レゾルシノールは、接着成分として作用する。レゾルシノールは、生体為害性が低い。添加量は、0.1~20%（重量比）が好ましい。これ以上高濃度になると、生体為害性が無視できなくなり、また、架橋後の接着剤の弾性が低下して操作性が悪くなり、適用部位から剥がれやすくなる。

【0016】

【作用】この発明にかかるコラーゲン-リン酸カルシウム複合材料は、生体硬組織を構成するコラーゲンを主材料とするため、生体親和性や柔軟性に優れている。さらに、これに化学活性を有するリン酸カルシウムを配合しているため、生体組織と経時的に置換する。化学活性を有するリン酸カルシウムは、加水分解反応に伴って生体硬組織の主成分である $\text{CO}_3\text{-Ap}$ 、OCPを合成するからである。

【0017】また、ゲル化エネルギーを有するコラーゲンに、結晶転化エネルギーを有するリン酸カルシウムを加水分解反応させて複合化させているため、両者の効果を良好に得ることができる。化学活性を有するリン酸カルシウムは、リン酸イオンを含有する水溶液中で加水分解反応を行うことによって、結晶界面上で経時的に相転移反応により、結晶転化する。この結晶転化において、中性pH領域では、準安定相のOCPが生成・生長する。このOCPが、カルボキシル基を有するコラーゲンのカルボキシル基と反応して生成する。この反応により、

化合物を形成する。

【0018】この発明にかかる生体用接着剤は、上記この発明の複合材料にゼラチンおよびレゾルシノールを添加してなるため、生体親和性が高く、しかも高い接着性を有する。

【0019】

【実施例】以下に、この発明の実施例を示すが、この発明は下記実施例に限定されない。

－実施例1－

10 無菌濾過（0.45 μm ）を行ったリン酸緩衝液（pH7）に、紫外線滅菌したOCPを、OCP/リン酸緩衝液=0.25g/10mlの割合で加え、1時間攪拌した。次に、紫外線滅菌したコラーゲン-IP（セルマトリックス-IP：新田ゼラチン社製）の0.3%水溶液（pH3）を、リン酸緩衝液：コラーゲン溶液=1：1の比で混合し、5分間攪拌した。得られた複合物をマルチプレートへ分注し、 CO_2 インキュベーター（37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 =5%）内に1日、3日、1週間放置した。これらを結晶転化、結晶成長を分析する目的で10%ホルマリン処理および100%エタノール処理して風乾し、複合材料を得た。

【0020】－実施例2－

タンニン酸を0.2%（W/V）加えたリン酸緩衝液を用いた以外は実施例1と同様にした。

－実施例3－

OCPの代わりに、150 $^{\circ}\text{C}$ 乾熱滅菌した α -TCPを、 α -TCP/リン酸緩衝液=1g/10mlの割合で加えた以外は、実施例1と同様にした。

【0021】－実施例4－

30 OCPの代わりに、150 $^{\circ}\text{C}$ 乾熱滅菌した α -TCPを、 α -TCP/リン酸緩衝液=1g/10mlの割合で加えた以外は、実施例2と同様にした。

－比較例1－

α -TCPの代わりに、150 $^{\circ}\text{C}$ 乾熱滅菌したHApを用いた以外は実施例3と同様にした。

【0022】－比較例2－

40 α -TCPの代わりに、150 $^{\circ}\text{C}$ 乾熱滅菌したHApを用いた以外は実施例4と同様にした。実施例1~4および比較例1、2について、ゲル化の観察、凍結乾燥および以下の物性測定を行った。結果を表1、図1~5に示した。

〔測定方法〕

（1） pH測定

所定時間ごとに採取したゲル状複合物のpHを、pHメーターを用いて測定した。

（2） X線回析

得られた複合材料を、粉末X線回析装置（MXP⁺、マックサイエンス社製）を用いて、同定した。

（3） 走査電顕

50 得られた複合材料を、走査電子顕微鏡（CS-2100

A型、株式会社日立製作所製)で表面を観察した。

【表1】

【0023】

		実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	比較例1	比較例2
リン酸カルシウム		OCP	OCP	α -TCP	α -TCP	HAp	HAp
タンニン酸		—	含有	—	含有	—	含有
ゲル化注	1日後	有り(3)	ゲル状沈殿	有り(2)	ゲル状沈殿	有り(1)	ゲル状沈殿
	3日後	有り(2)	ゲル状沈殿	有り(2)	ゲル状沈殿	有り(1)	ゲル状沈殿
	1週間後	有り(2)	ゲル状沈殿	有り(2)	ゲル状沈殿	有り(1)	ゲル状沈殿

(注) ゲル化有りの場合、括弧内は硬さを表す。ゲルの硬さ：(1) > (2) > (3)
ゲル状沈殿の場合、沈殿量は少量である。

【0024】1. ゲル化

表1にみるように、タンニン酸を加えない系では、初期に良好なゲル化を示し、経時的に硬さを増し、結晶生成が行われている。一方、タンニン酸を加えた系では、ゲル状の沈殿が生じ、複合化物の均一なゲル化がいささか阻害されている。

2. pH測定

図1はタンニン酸を加えない系であり、図2はタンニン酸を加えた系であるが、これらの図にみるように、いずれも、pHは、経時的に中性付近に落ち着いてくる傾向がみられた。

3. X線回折

図4にみるように、 α -TCPを用いた系(実施例3、4)では、1、3日後にOCPを形成しつつアパタイトへの結晶転化を開始し、ほぼ1週間後に完全にアパタイトへ置換している。OCPを用いた系(実施例1、2)でも、図3にみるように、若干ではあるが、アパタイトの合成が確認される。これらのアパタイトは、その一部が炭酸アパタイトであると考えられる。比較例では、図5にみるように、結晶転化はほとんど確認されなかった。

4. 走査電顕

OCPの系(実施例1、2)では、1日後では、ほぼ全面的に鱗片状ないしウロコ状の結晶で覆われており、母体結晶表面は比較的平坦である。3日、1週間後になると、母体結晶表面に顆粒状の結晶が目立つようになる。タンニン酸含有の有無による違いは観察されなかった。

【0025】 α -TCPを用いた系のうち、タンニン酸非含有系では(実施例3)、顆粒状の整った構造が観察され、生成した結晶どうしの絡み合いとコラーゲンによるマトリックスで複合材料を構成していると思われる。また、タンニン酸含有系(実施例4)の3日後では、典型的なOCP生成を示す花弁状の結晶構造が観察され、OCPへの結晶転化がうかがえる。

【0026】比較例では、結晶成長は観察されなかつ

結乾燥した。タンニン酸含有系では、バサバサ感が有り、乾燥に時間を有した。一方、タンニン酸無添加のものでは、全て良好な柔軟性を有する綿状物となった。

—実施例5—

紫外線滅菌したコラーゲン-I Pの0.3%水溶液(pH3)、MEM培地10倍濃度溶液および再構成用緩衝液を、8:1:1の割合で混合した。この混合液に、150℃乾熱したOCPを、OCP/混合液=0.5g/10mlの割合で加え、1時間攪拌した。得られた複合物をマルチプレートへ分注し、CO₂インキュベーター(37℃、CO₂=5%)内に1日、3日、1週間、2週間、3週間放置した。これらを結晶転化、結晶成長を分析する目的で10%ホルマリン処理および100%エタノール処理して風乾し、複合材料を得た。

【0027】—実施例6—

混合液は、紫外線滅菌したコラーゲン-I Pの0.3%水溶液(pH3)、BGJ-b培地5倍濃度溶液および再構成用緩衝液を、7:2:1の割合で混合したものとした以外は実施例5と同様にした。

—実施例7—

OCPの代わりに、150℃乾熱滅菌した α -TCPを用いた以外は、実施例5と同様にした。

【0028】—実施例8—

OCPの代わりに、150℃乾熱滅菌した α -TCPを用いた以外は、実施例6と同様にした。

—実施例9—

OCPの代わりに、150℃乾熱滅菌したTeCPを用いた以外は、実施例5と同様にした。

【0029】—実施例10—

OCPの代わりに、150℃乾熱滅菌したTeCPを用いた以外は、実施例6と同様にした。

—比較例3—

OCPの代わりに、150℃乾熱滅菌したHApを用いた以外は、実施例5と同様にした。

【0030】—比較例4—

OCPの代わりに、150℃乾熱滅菌したHApを用い

た以外は、実施例6と同様にした。実施例5～10および比較例3、4について、上述の物性測定を行った。結果を図6～27に示した。

1. pH測定

図6、7にみるように、実施例5、6（OCPを用いた系）および比較例3、4（HApを用いた系）では、pH変動は小さく比較的安定している。実施例7、8（ α -TCPを用いた系）では、pHは経時的に酸性側へ推移するが、BGJ-b培地を用いた実施例8の方がわずかながら変動幅が小さくなっている。したがって、適切な培地の選択等によってpH変動を抑制し得ると考えられる。実施例9、10（TeCPを用いた系）では、pHは、初期は変動するが、次第に中性に安定してくる。

2. X線回折

OCPを用いた系（実施例5、6）では、図8～11にみるように、経時的な結晶転化は、あまり確認されないが、これらは図12に示すように、初期より、一部炭酸アパタイトを合成している。 α -TCPを用いた系（実施例7、8）では、図13～16にみるように、経時的な結晶転化が確認された。この転化反応は、図17に示すように、ほぼ1週から2週の間に完了しており、 α -TCPピークの減退とともに炭酸アパタイトから水酸アパタイトへと移り変わっている。TeCPを用いた系（実施例9、10）でも、図18～21にみるように、経時的な結晶転化が確認された。この転化反応は、図22に示すように、同じくほぼ1週から2週の間に完了し

ていて、初期より水酸アパタイトを合成しており、経時的にTeCPピークが減退する。一方、図23～27にみるように、比較例では、経時的な結晶転化がほとんど確認されなかった。

3. 走査電顕

OCPを用いた系（実施例5、6）では、結晶表面が比較的平坦であり、部分的に鱗片状結晶が確認される。 α -TCPを用いた系（実施例7、8）では、終始、花弁状構造を示し、長期的には、大きな顆粒も確認され、OCPが合成されていることが分かる。BGJ-b培地を用いた実施例8の方が、大きな花弁状構造を示しており、 α -TCPの活性度が高いようである。また、TeCPを用いた系（実施例9、10）では、大きな顆粒表面に微細な顆粒状結晶が多く観察され、 α -TCPを用いた系と同様、BGJ-b培地を用いた実施例10の方が、TeCPの活性度が高いようである。一方、比較例では、表面の結晶構造は終始変化をみせなかった。

【0031】さらに、実施例1～10、および比較例1～4の反応3日後ホルマリン無処理の各凍結乾燥物を被験材として、成熟家兔脛骨果部にドリル穴を開け充填し、止血効果を目視により判定するとともに、埋入6週後に周囲部を脱灰、非脱灰病理標本を作成した。その結果を表2に示す。

【0032】

【表2】

	止血効果	成熟家兔脛骨部埋入6週後の病理観察	
		非脱灰標本	脱灰標本
実施例 1	優良	複合物が新生骨と置換し、 海綿骨と連続していた。	複合物内で新生血管を核とし、 骨細胞がオステオンを形成。
実施例 2	優良	同上	破骨細胞が複合物内に存在し、 骨芽細胞が新生骨形成。
実施例 3	優良	同上	実施例1と同じ。
実施例 4	優良	同上	実施例2と同じ。
実施例 5	優良	同上	実施例1と同じ。
実施例 6	優良	同上	実施例1と同じ。
実施例 7	優良	同上	実施例1と同じ。
実施例 8	優良	同上	実施例1と同じ。
実施例 9	優良	同上	実施例1と同じ。
実施例 10	優良	同上	実施例1と同じ。
比較例 1	良好	複合物の周辺から骨が侵入 していた。	複合物内に新生血管が入っているが、 破骨細胞、骨芽細胞少ない。 異物巨細胞が結晶部に存在。
比較例 2	良好	同上	同上
比較例 3	良好	同上	同上
比較例 4	良好	同上	同上

【0033】

【発明の効果】この発明のコラーゲン—リン酸カルシウム複合材料は、生体活性度が高く、積極的な治癒効果が期待できる。さらに、プレス、カッティング等の成形が容易なうえ柔軟性にも優れるため、曲面部位への充填も可能である。また、加水分解反応過程にあるゲル状物は、三次元培養基材となり、さらに、これらを凍結乾燥すれば良好な柔軟性を有する綿状あるいは膜状のインプラント材となる。

【0034】また、この発明の生体用接着剤は、接着剤自身が生体にとって異物ではなく、自己修復細胞の増殖を促進することができる。このため、各種臓器の切開・切除面の止血、血管・臓器の接合および吻合部の接着に好適である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1、3および比較例1の複合材料のpHの経時的変動を示す。

【図2】実施例2、4および比較例2の複合材料のpHの経時的変動を示す。

【図3】実施例1、2の複合材料のX線回折装置による

30 【図4】実施例3、4の複合材料のX線回折装置によるチャートを示す。

【図5】比較例1、2の複合材料のX線回折装置によるチャートを示す。

【図6】実施例5、7、9および比較例3の複合材料のpHの経時的変動を示す。

【図7】実施例6、8、10および比較例4の複合材料のpHの経時的変動を示す。

【図8】実施例5の複合材料の1日経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

40 【図9】実施例5の複合材料の3週経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図10】実施例6の複合材料の1日経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図11】実施例6の複合材料の3週経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図12】実施例5の複合材料の経時的変化を示すX線回折チャートである。

【図13】実施例7の複合材料の1日経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

50 【図14】実施例7の複合材料の3週経過後のX線回折

装置によるチャートを示す。

【図15】実施例8の複合材料の1日経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図16】実施例8の複合材料の3週間経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図17】実施例7の複合材料の経時的変化を示すX線回折チャートである。

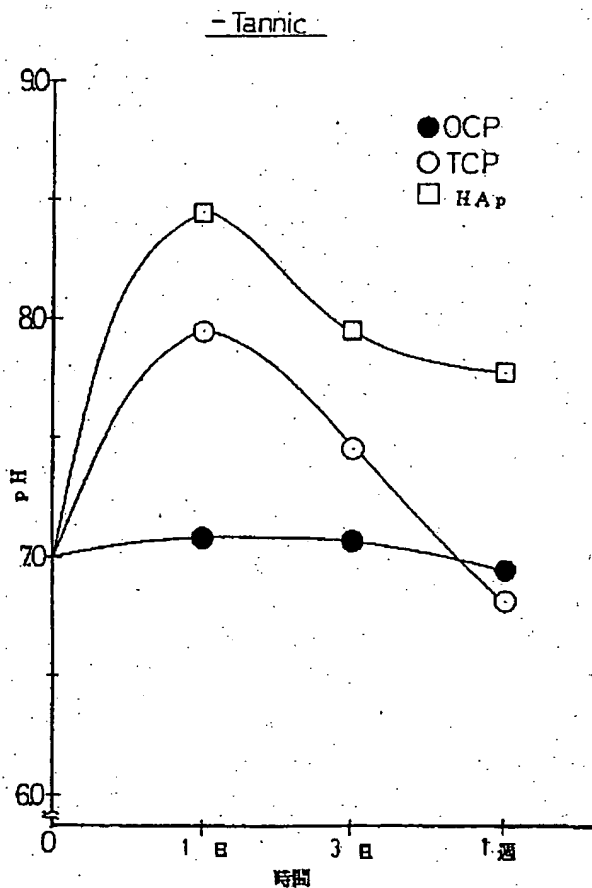
【図18】実施例9の複合材料の1日経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図19】実施例9の複合材料の3週間経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図20】実施例10の複合材料の1日経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図21】実施例10の複合材料の3週間経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図1】



折装置によるチャートを示す。

【図22】実施例9の複合材料の経時的変化を示すX線回折チャートである。

【図23】比較例3の複合材料の1日経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

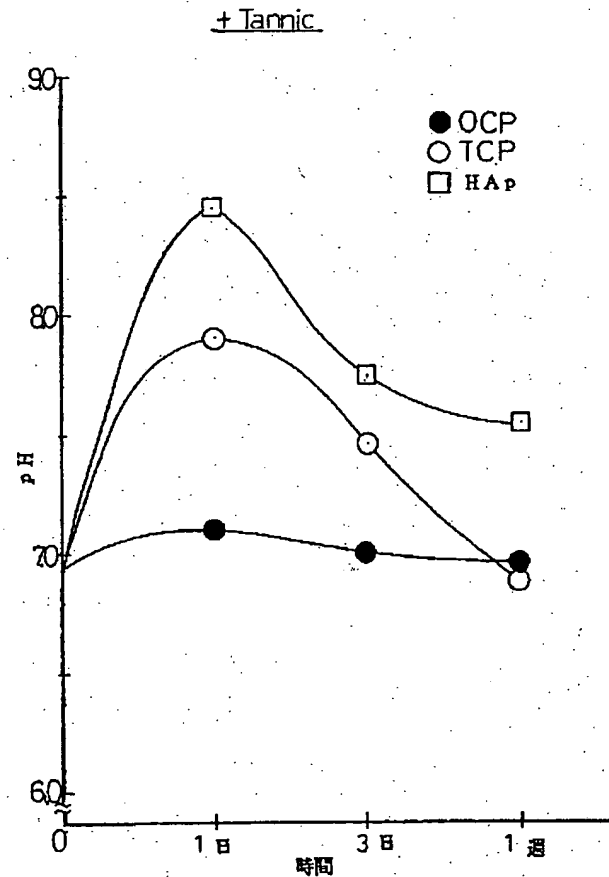
【図24】比較例3の複合材料の3週間経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図25】比較例4の複合材料の1日経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

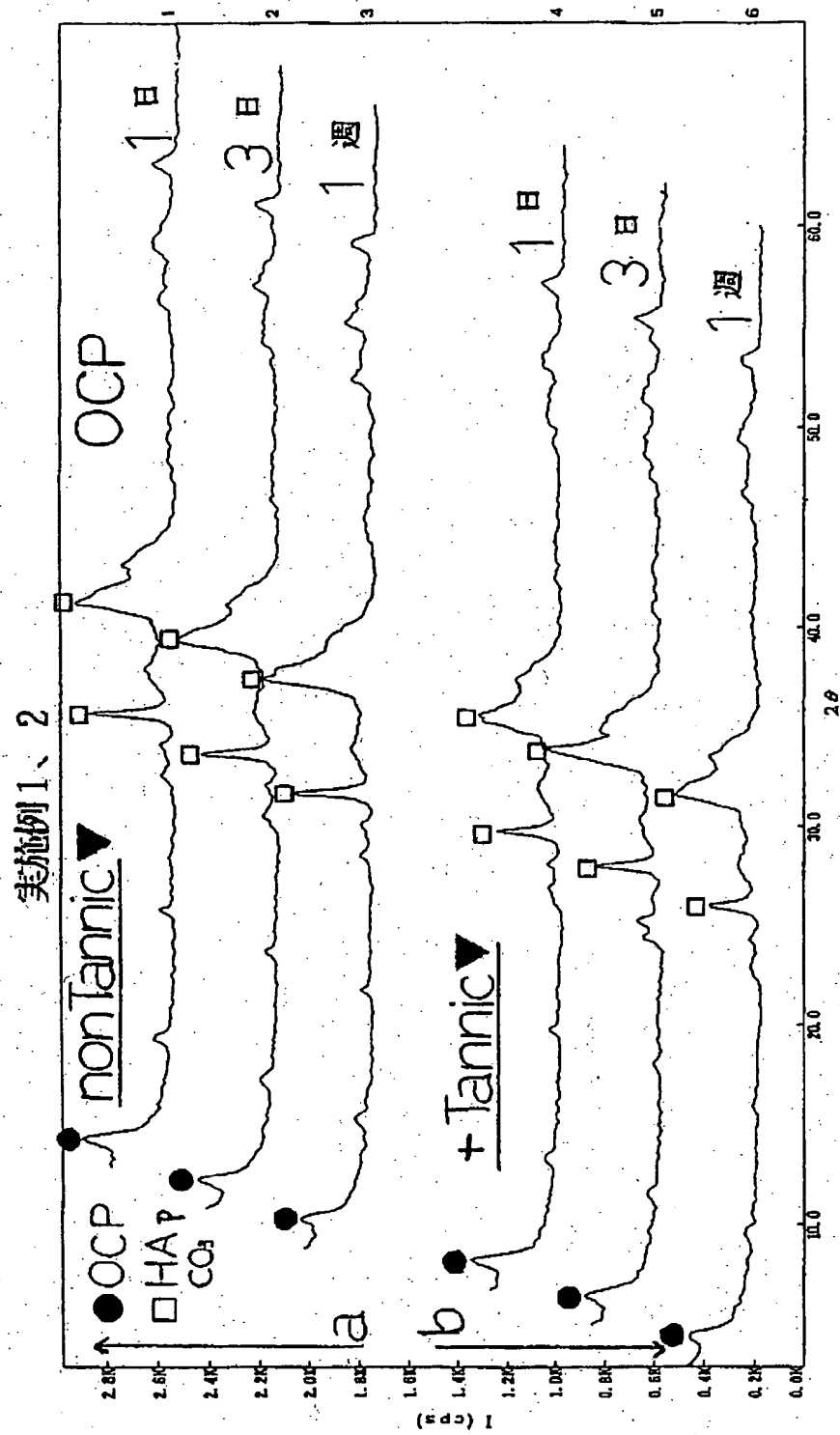
10 【図26】比較例4の複合材料の3週間経過後のX線回折装置によるチャートを示す。

【図27】比較例3の複合材料の経時的変化を示すX線回折チャートである。

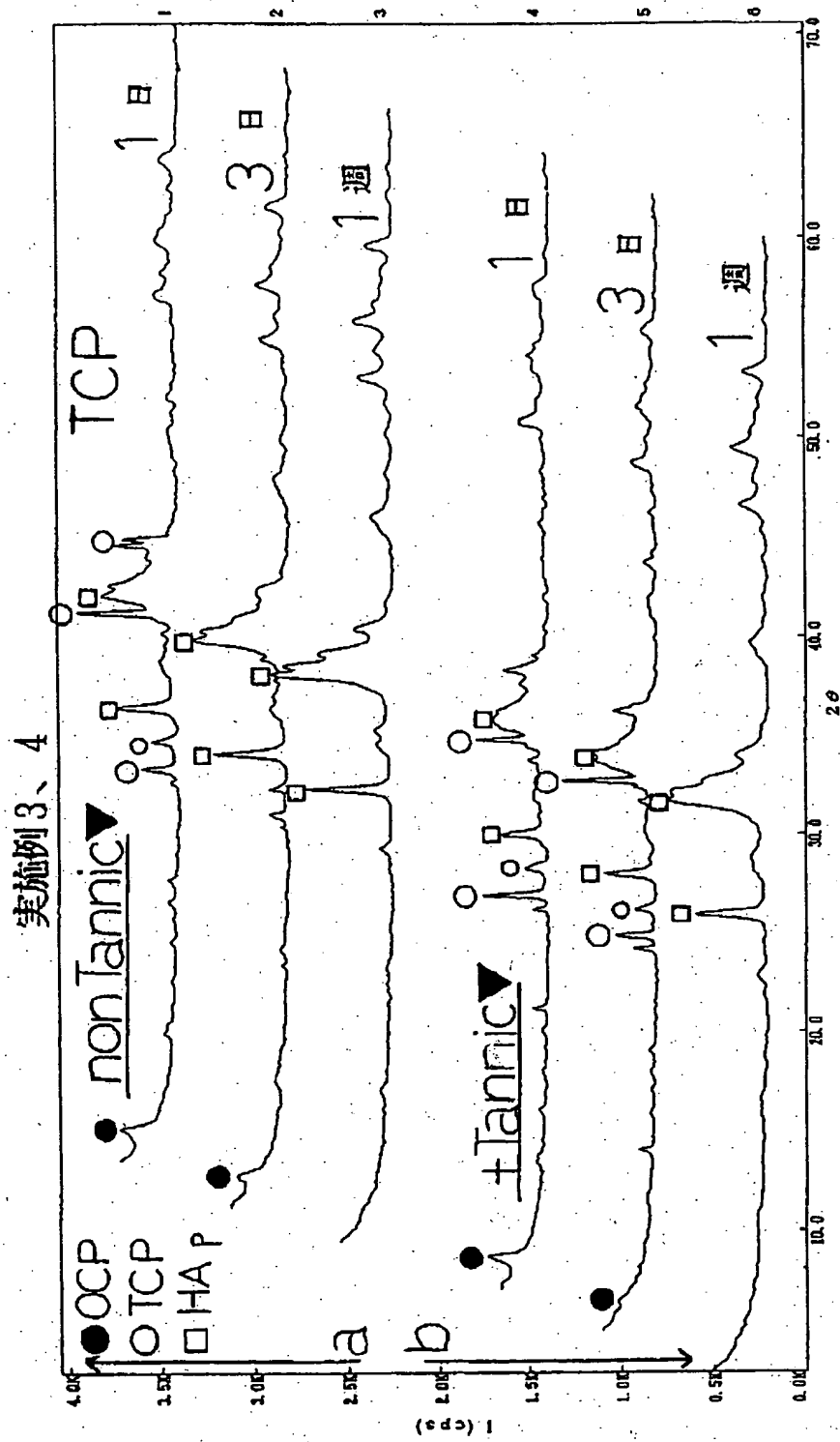
【図2】



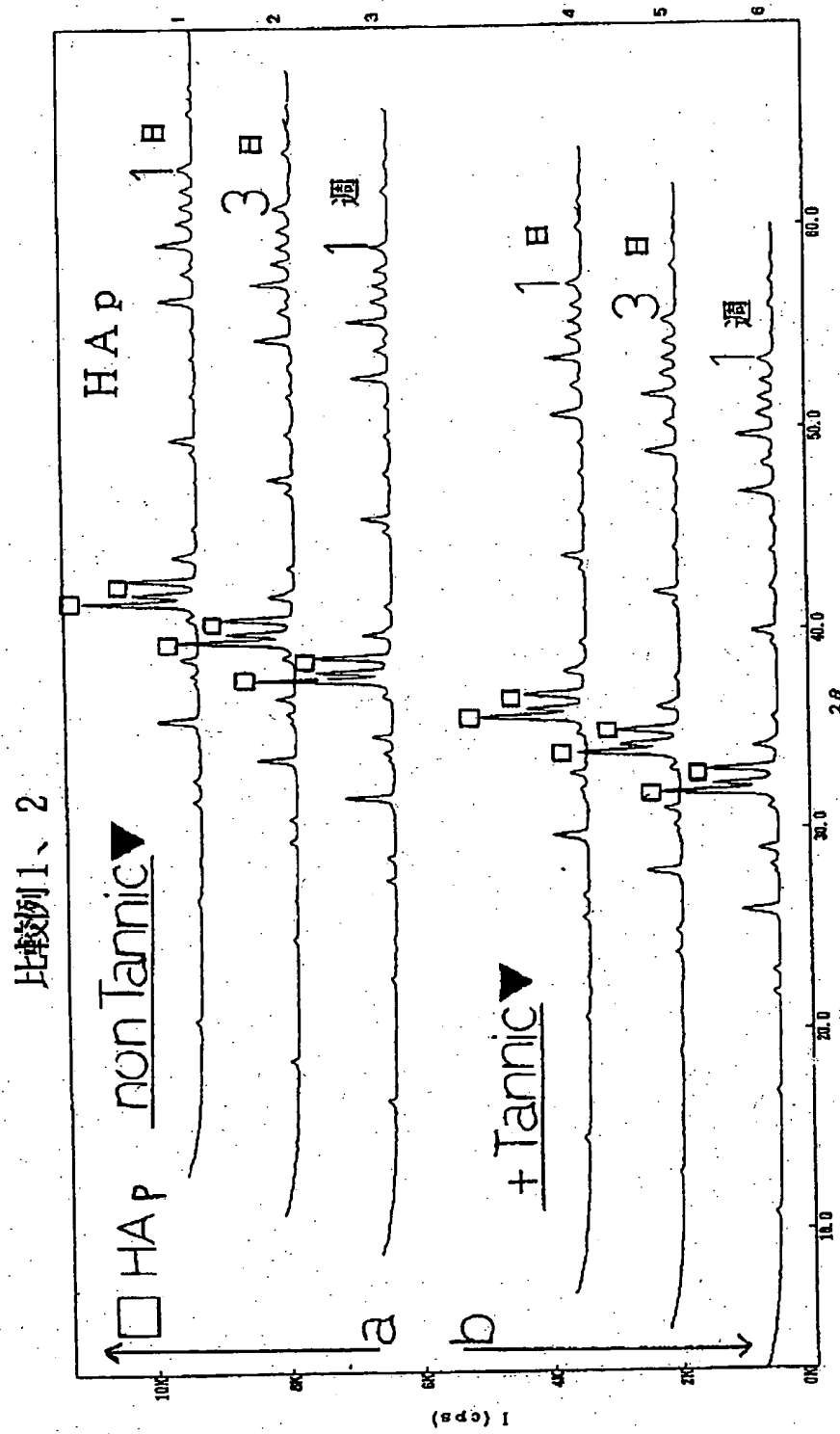
【図3】



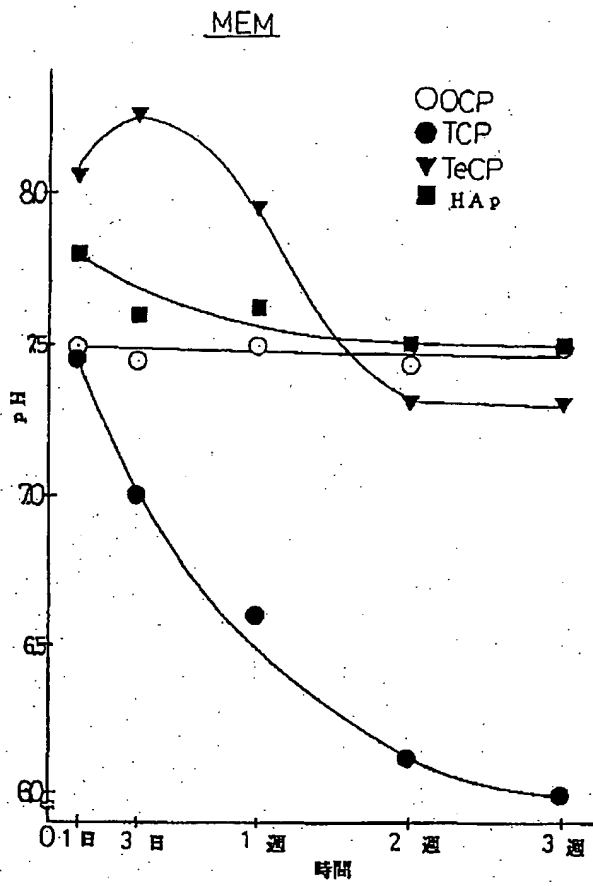
【図4】



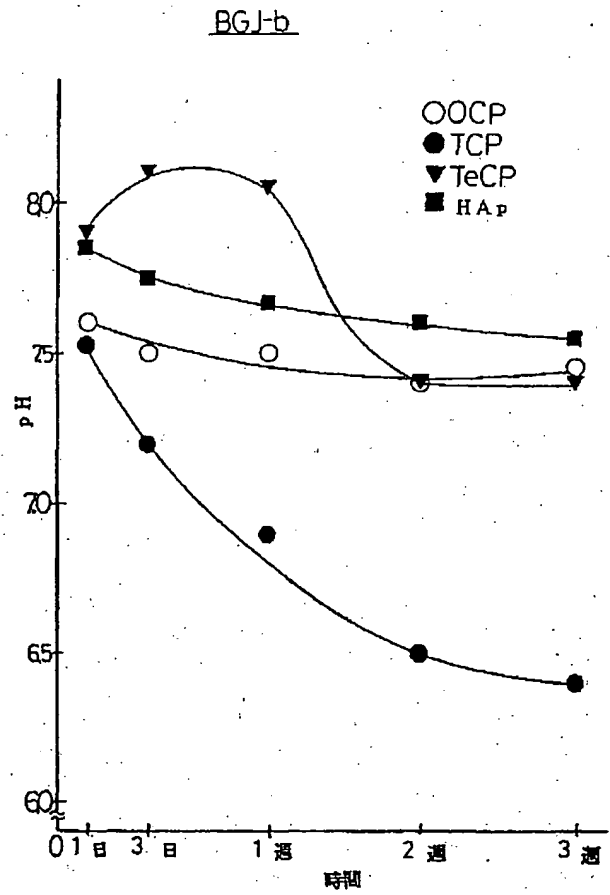
【図5】



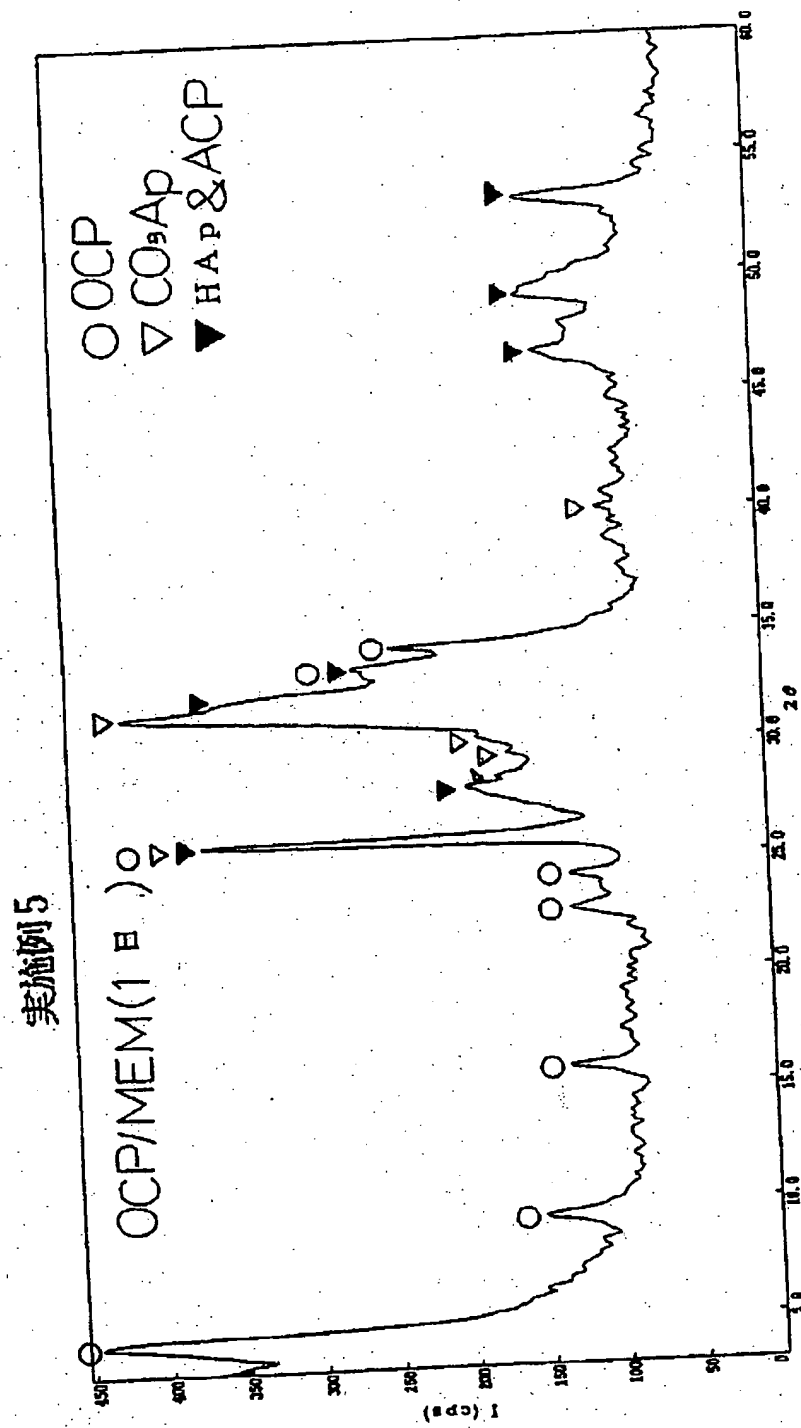
【図6】



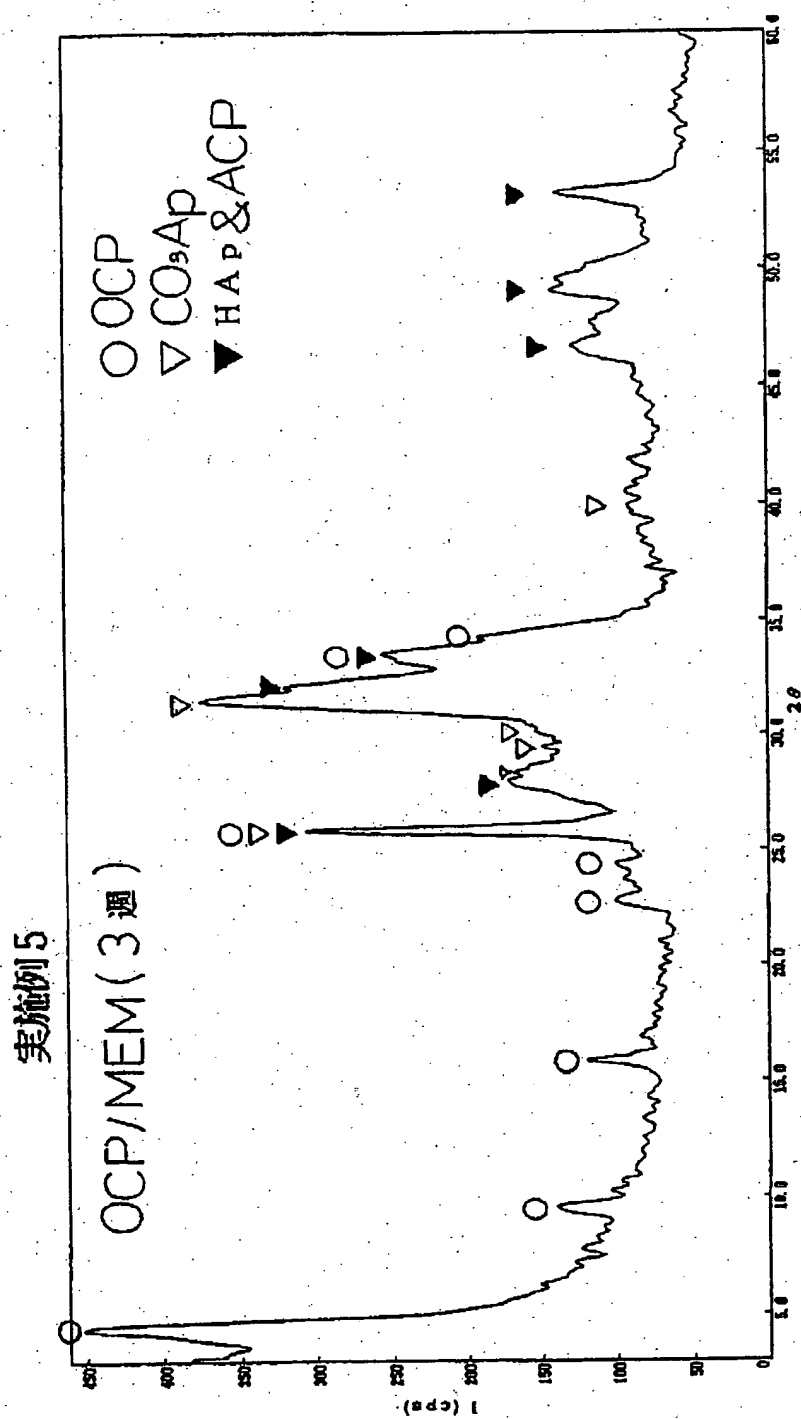
【図7】



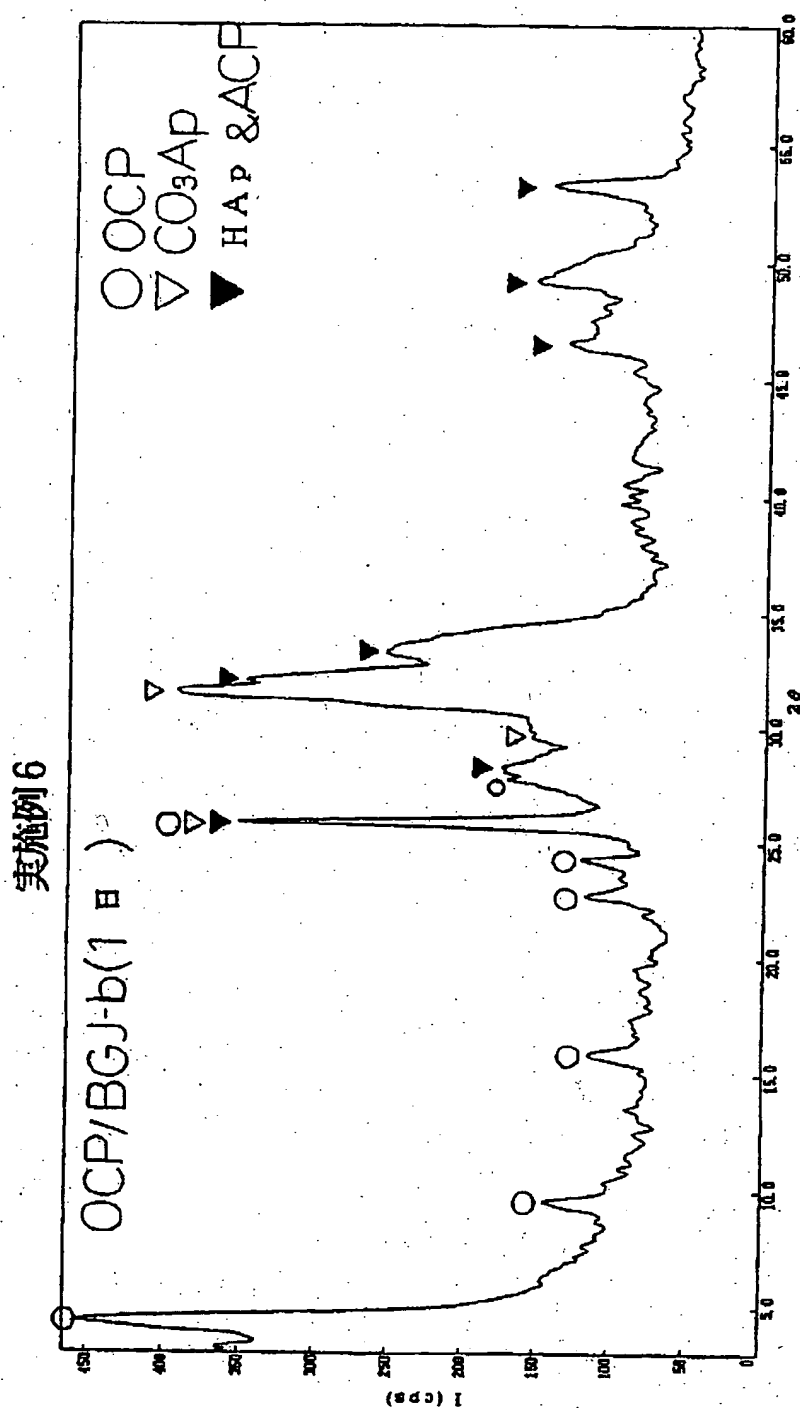
【図 8】



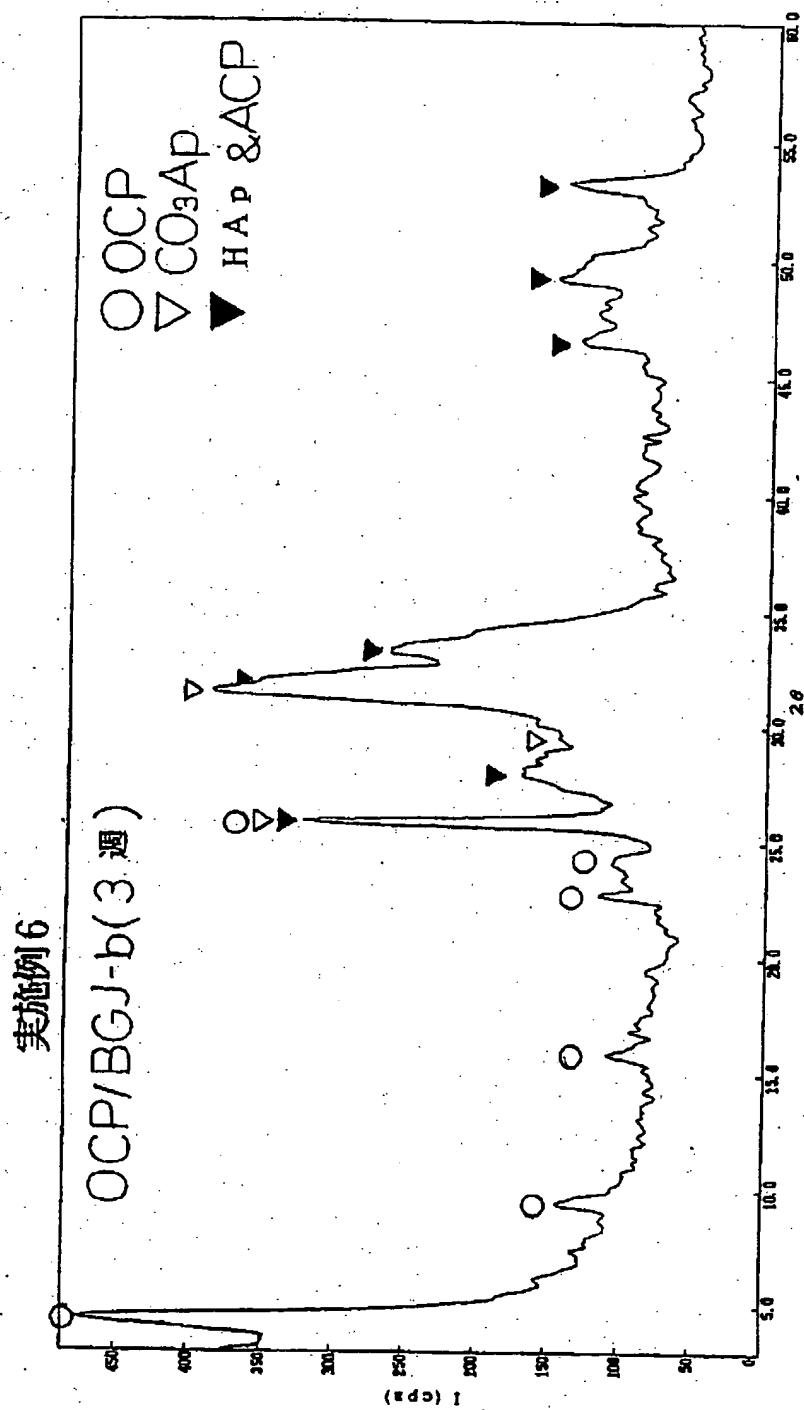
【図9】



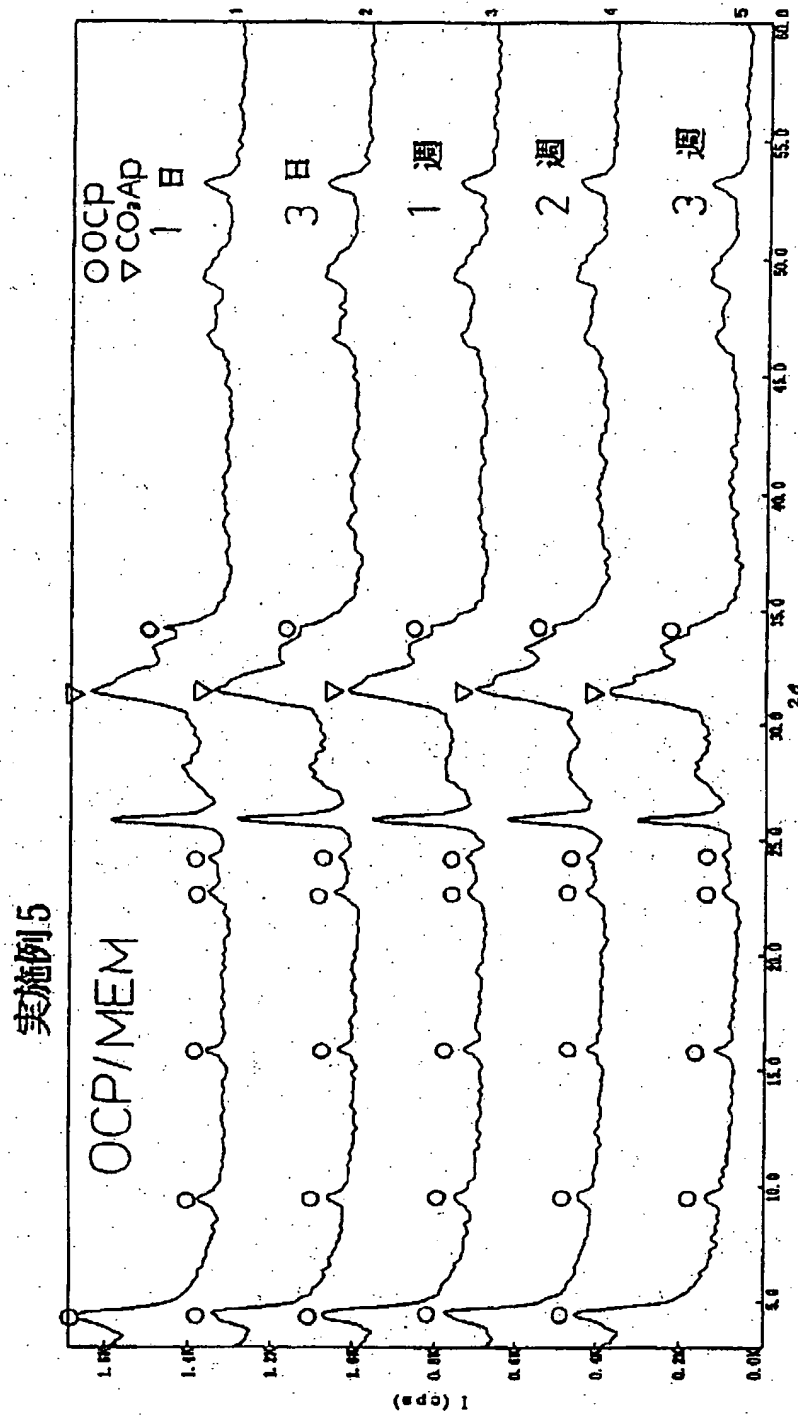
【図10】



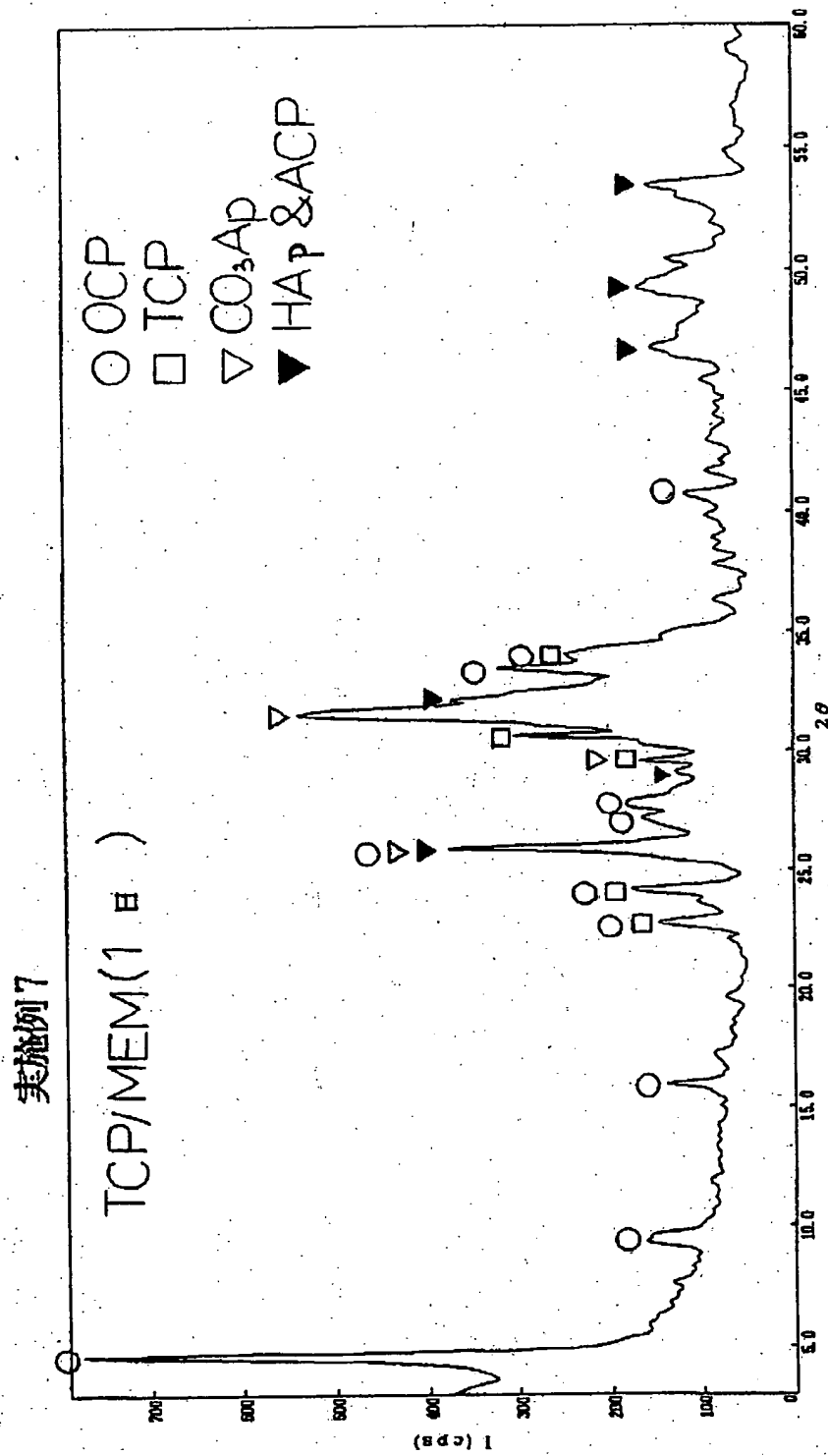
【図11】



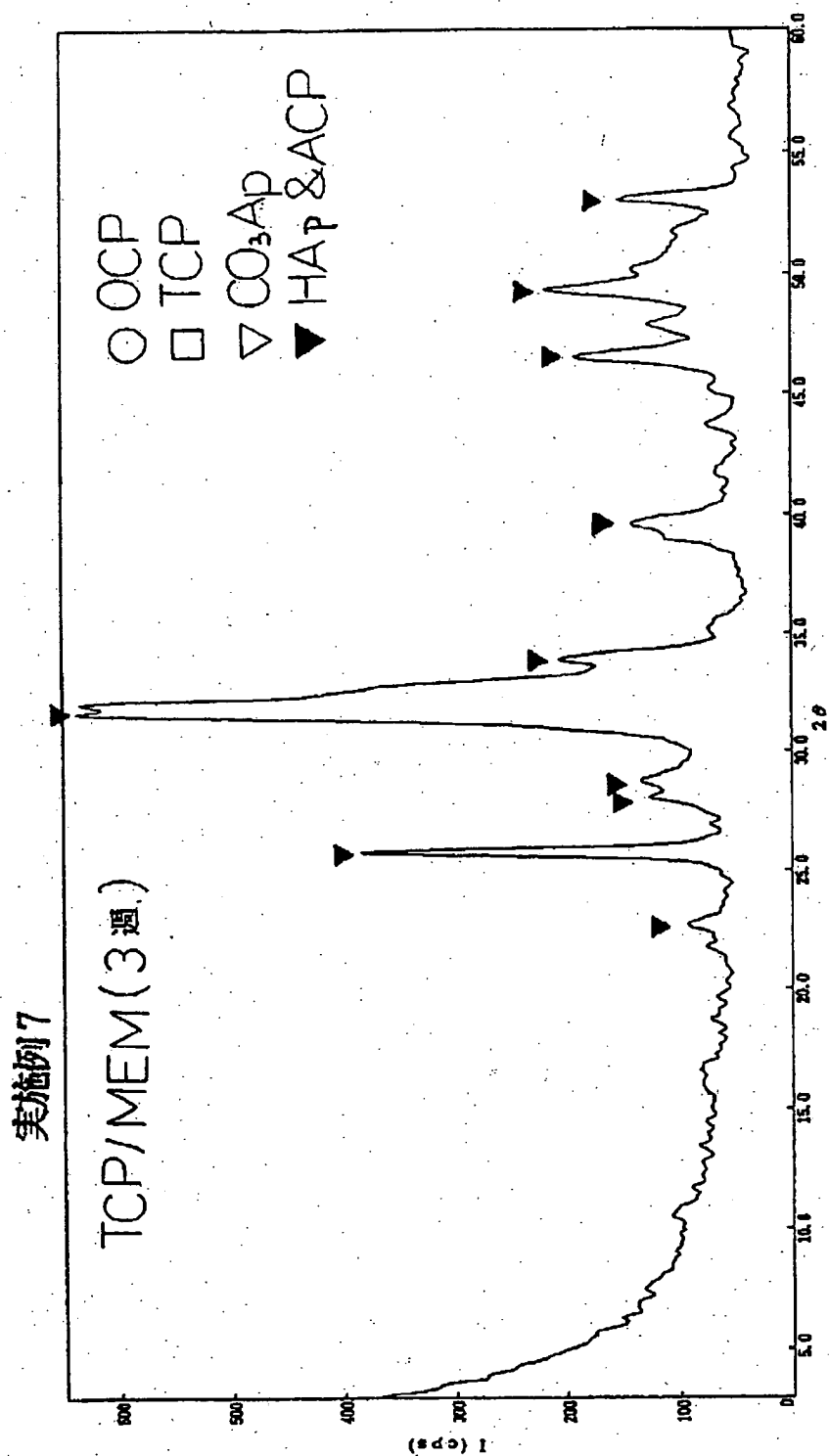
【図12】



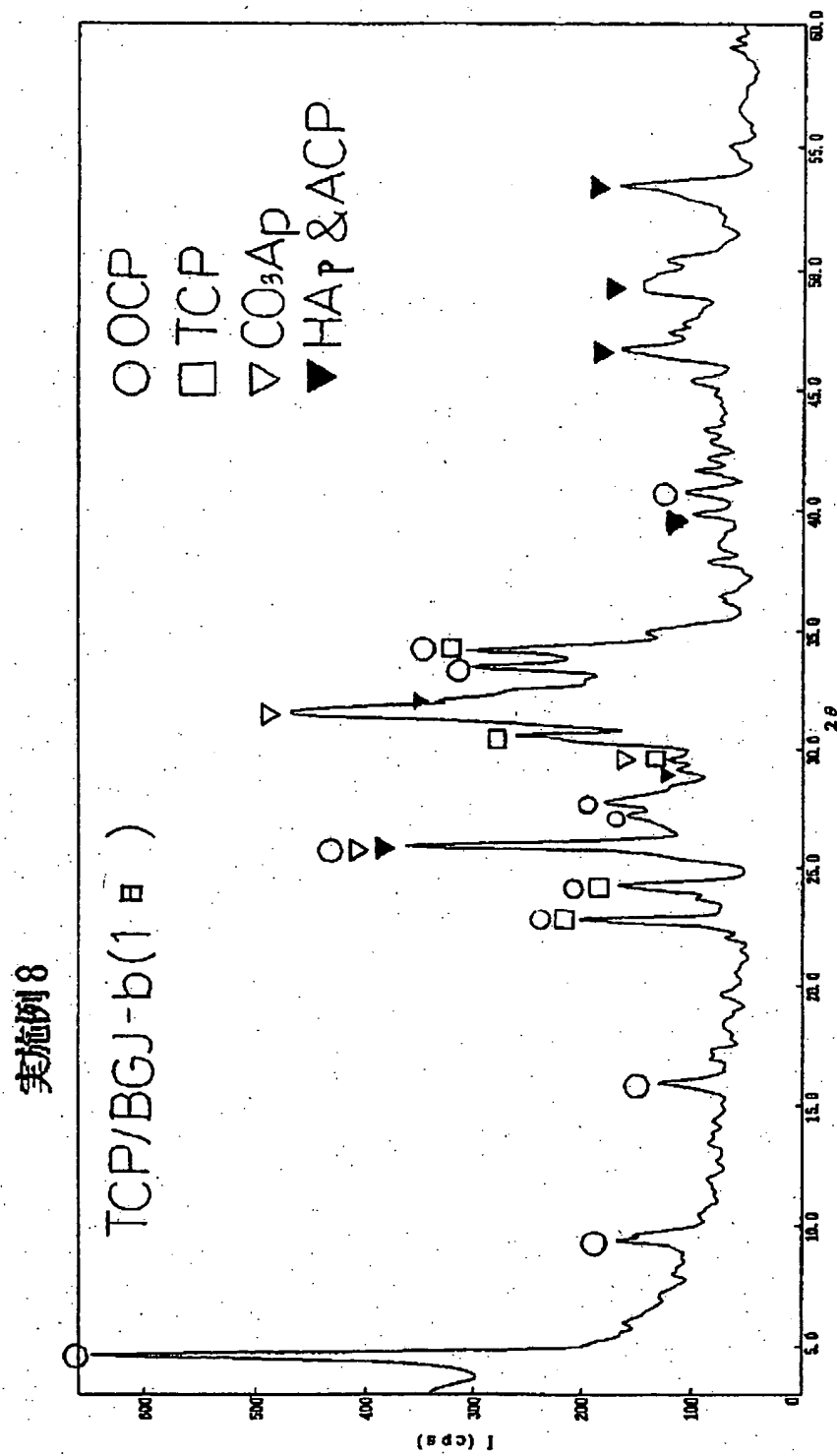
【図13】



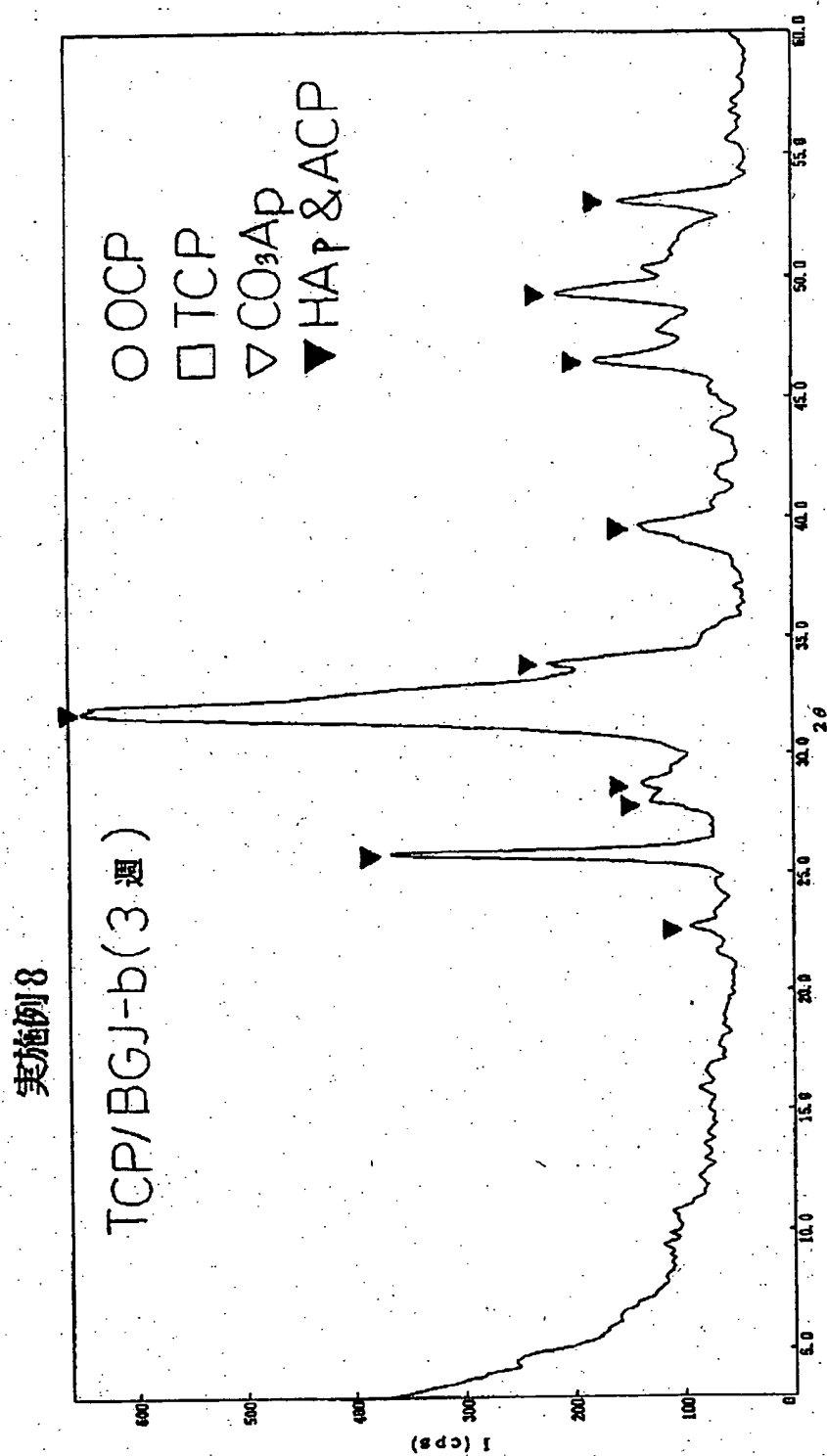
【図14】



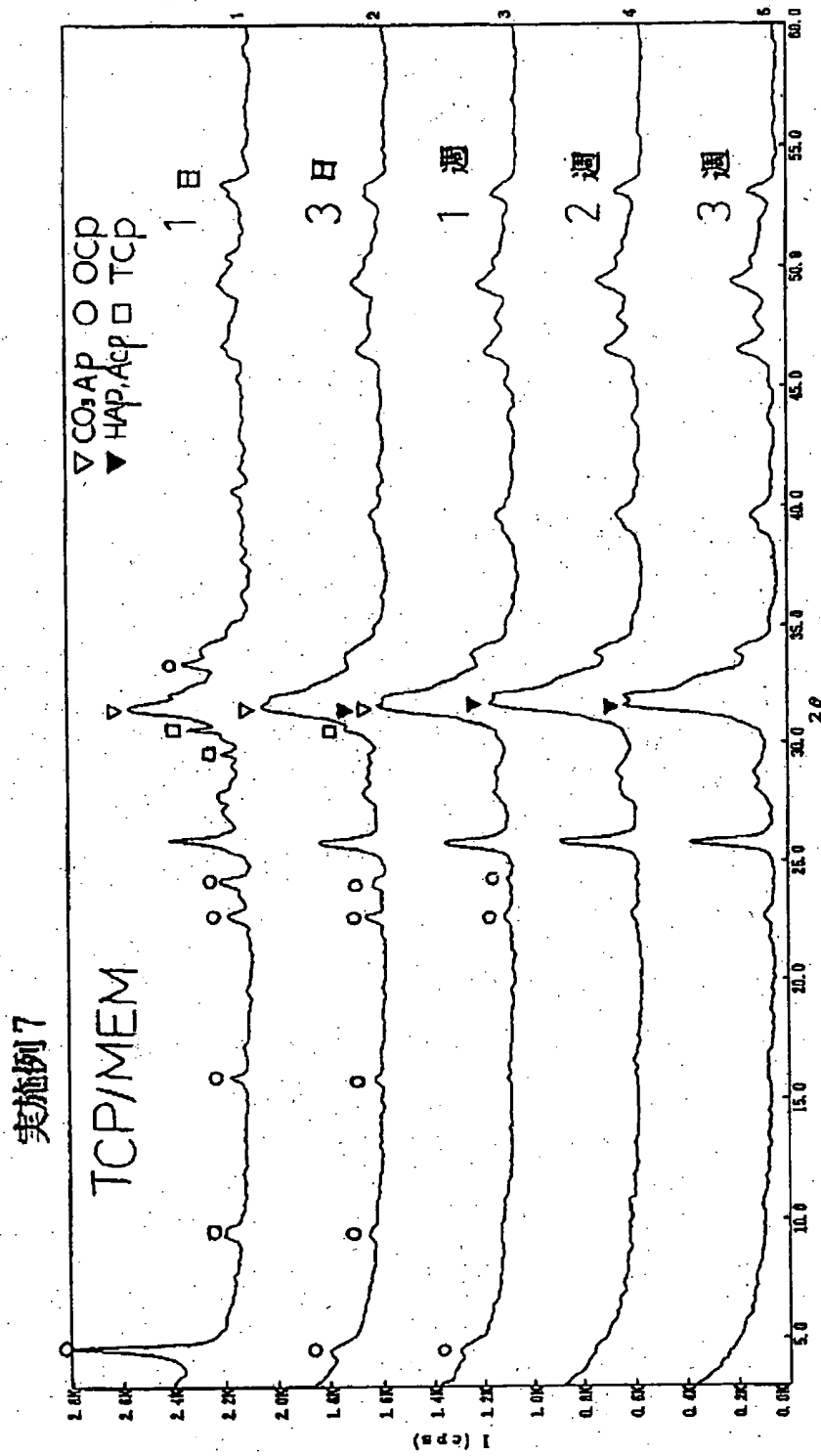
【図15】



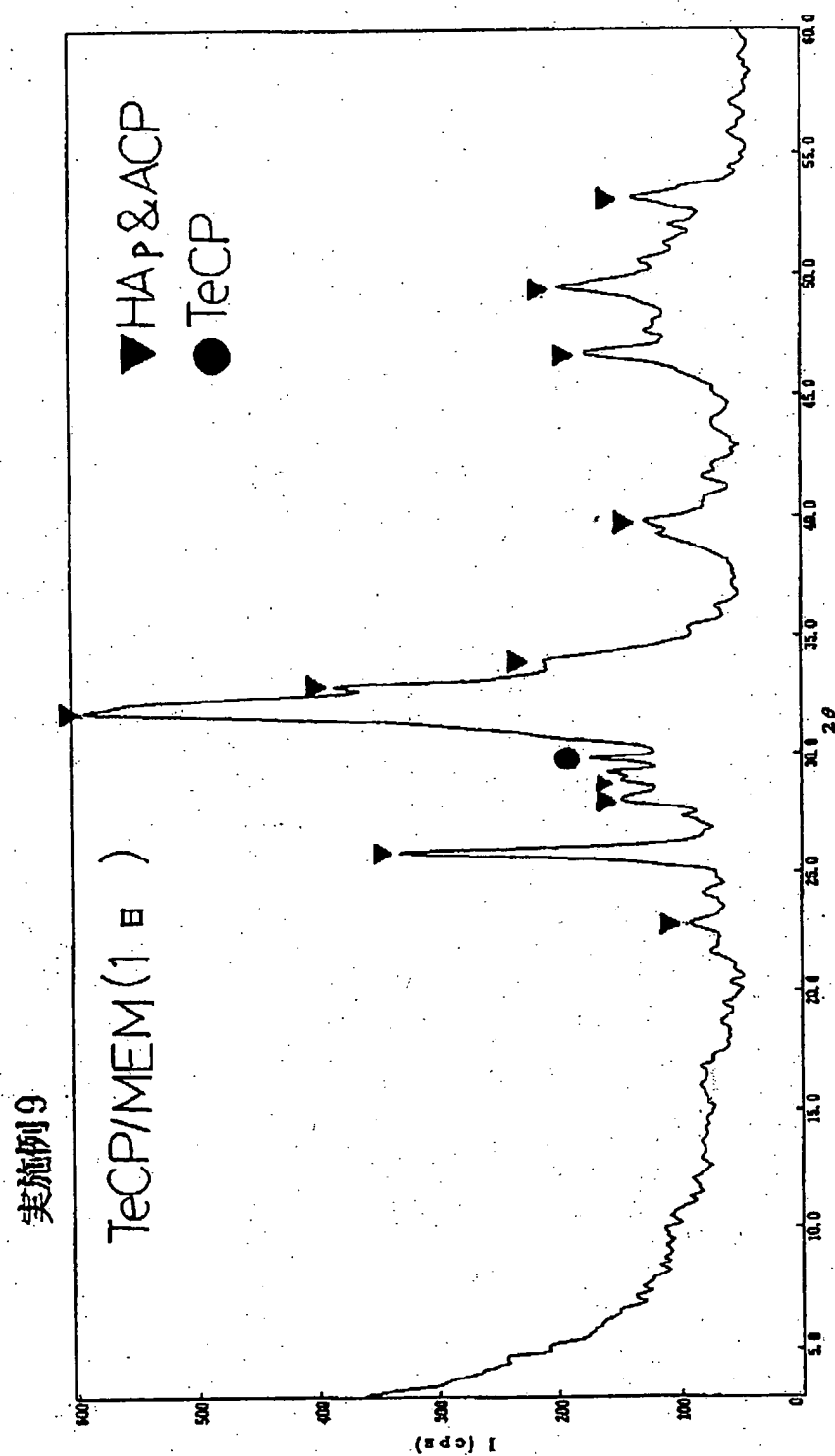
【図16】



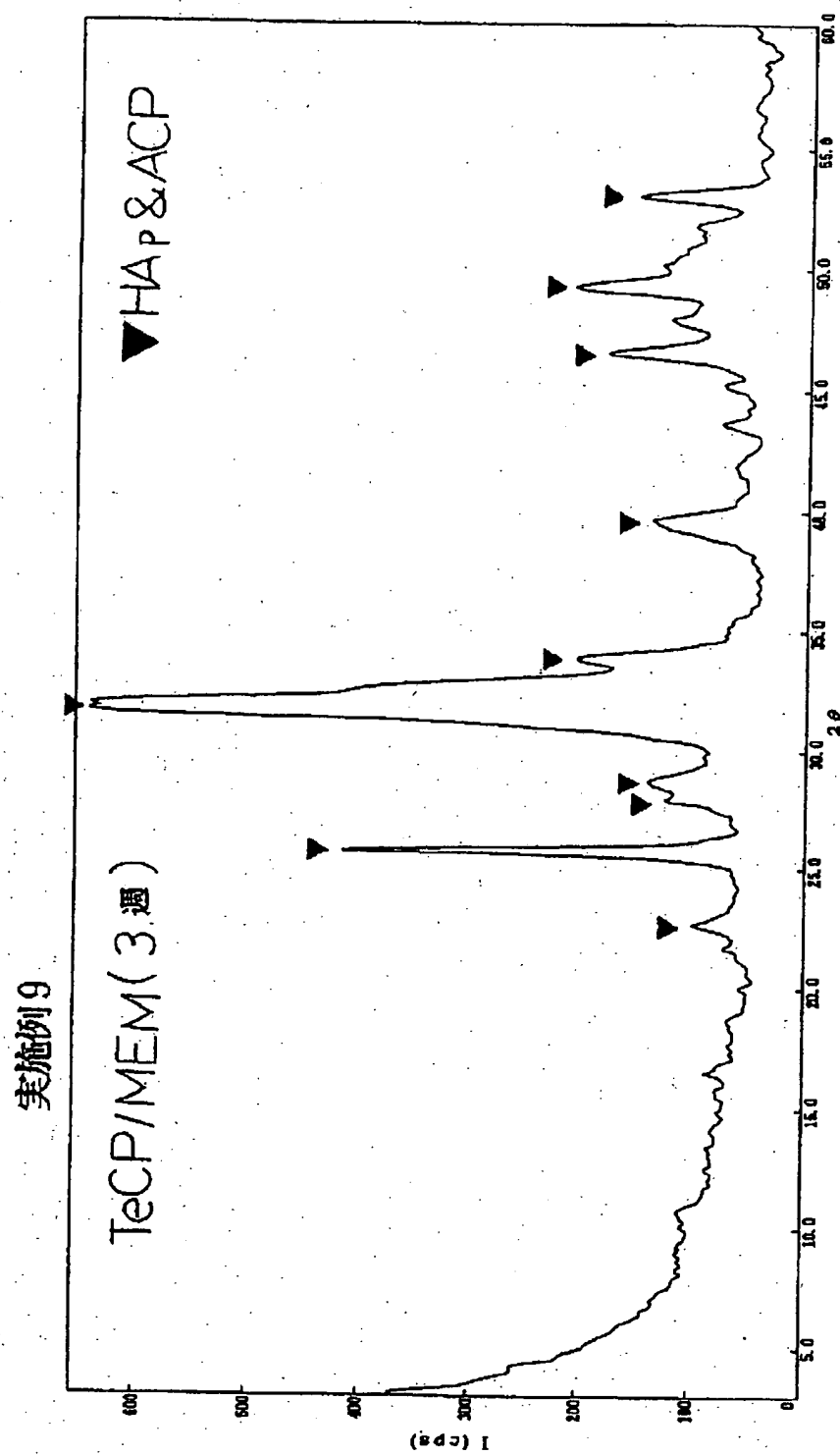
【図 1 7】



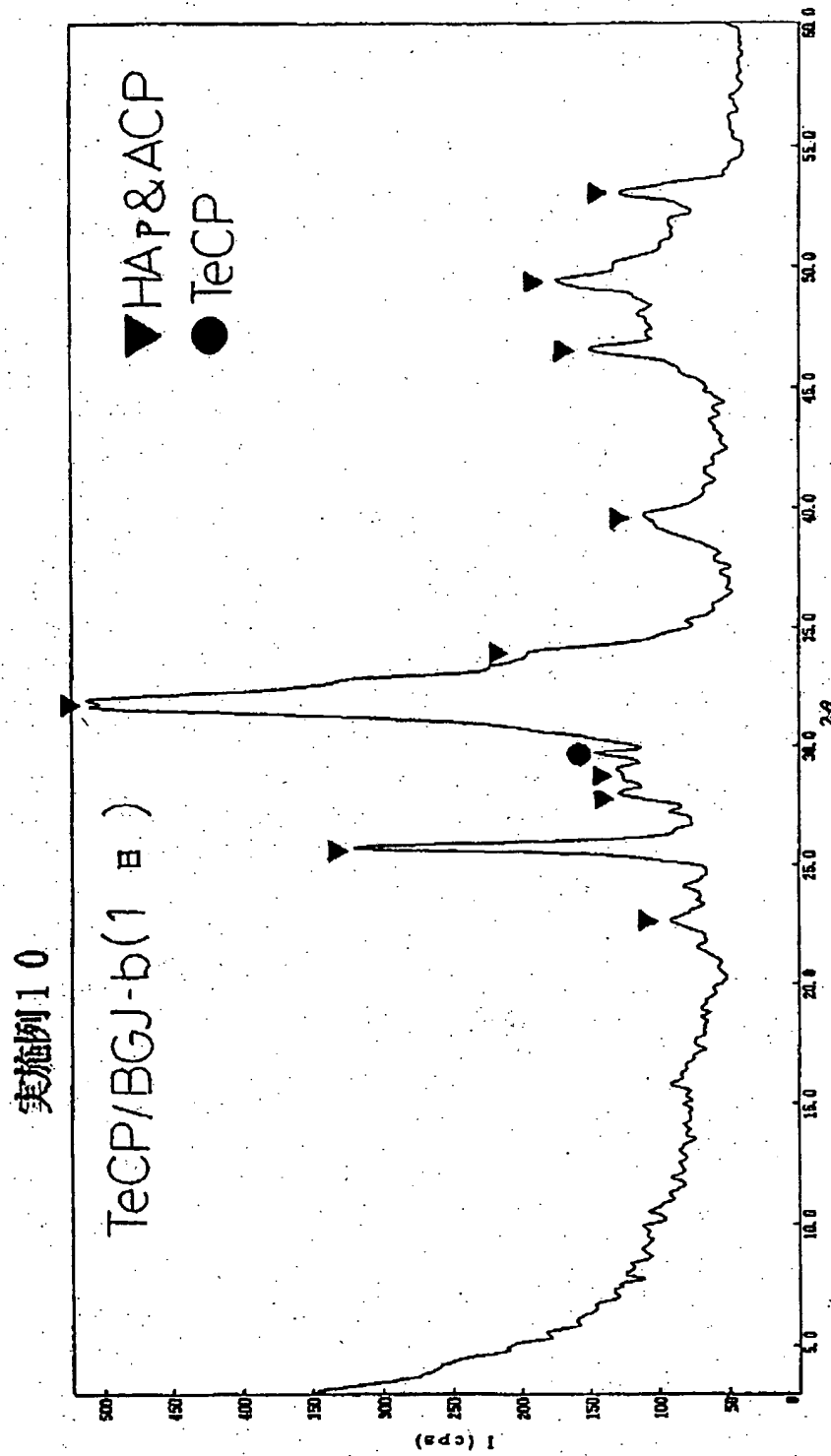
【図18】



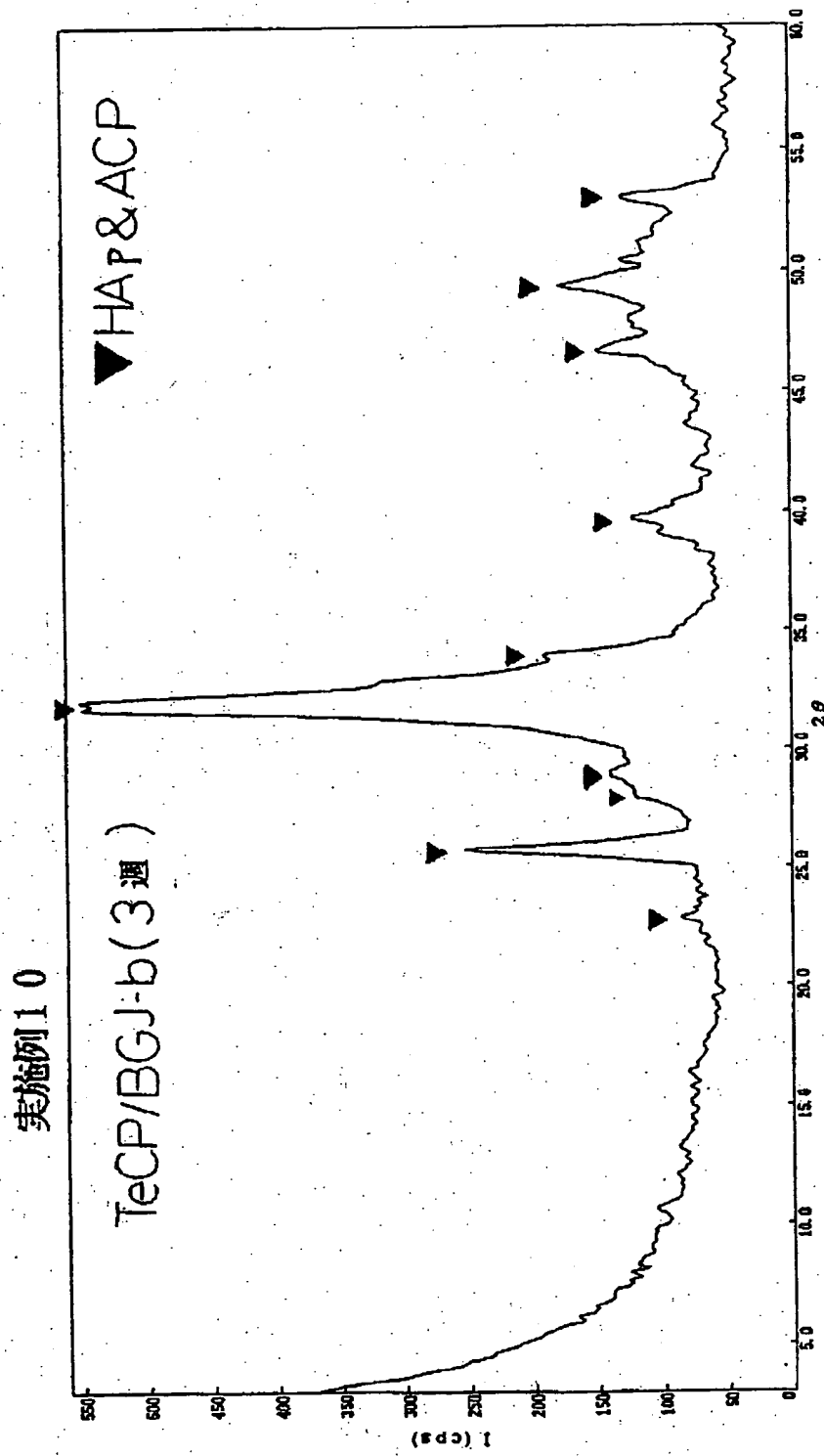
【図 19】



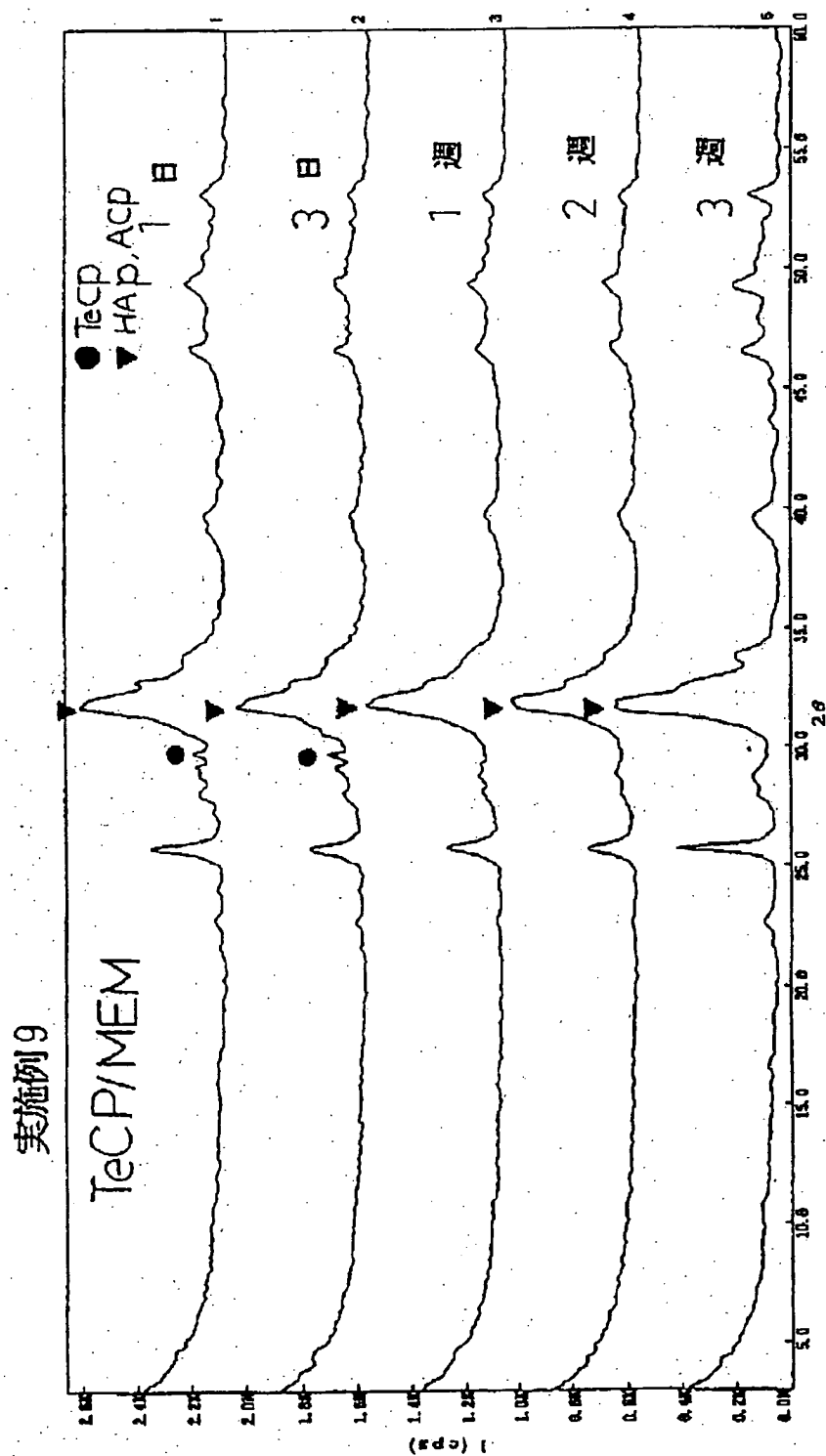
【図20】



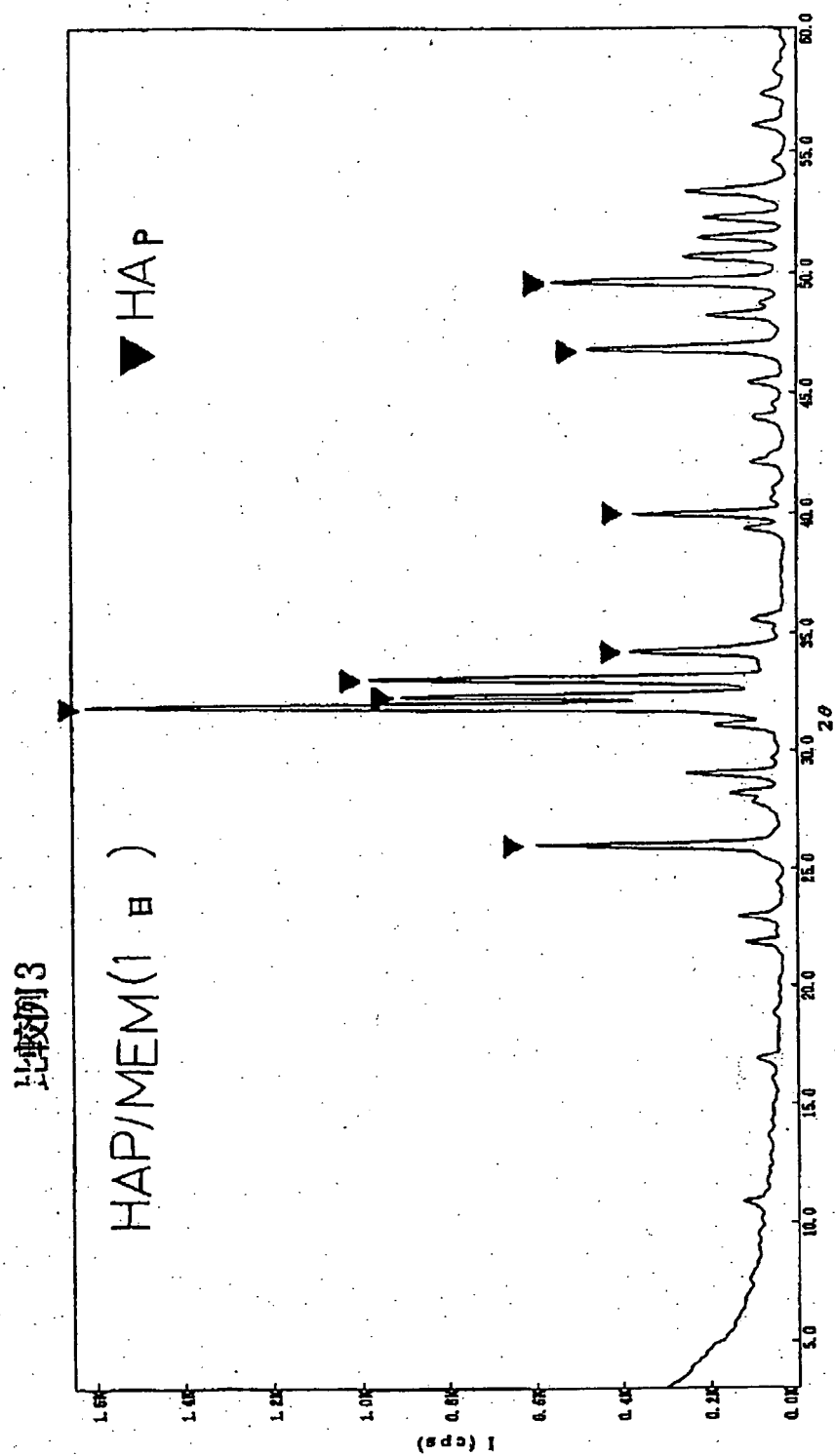
【図21】



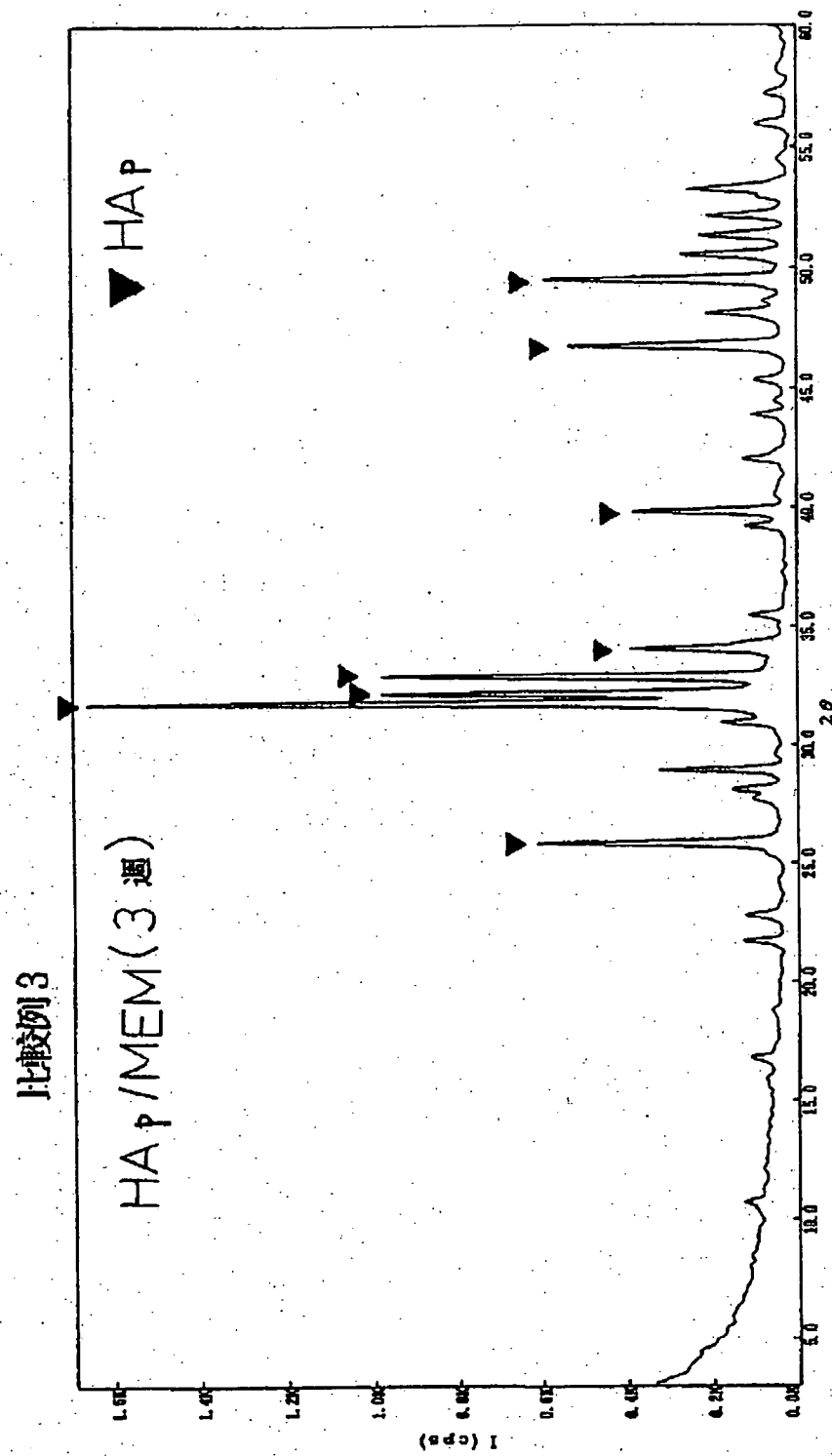
【図22】



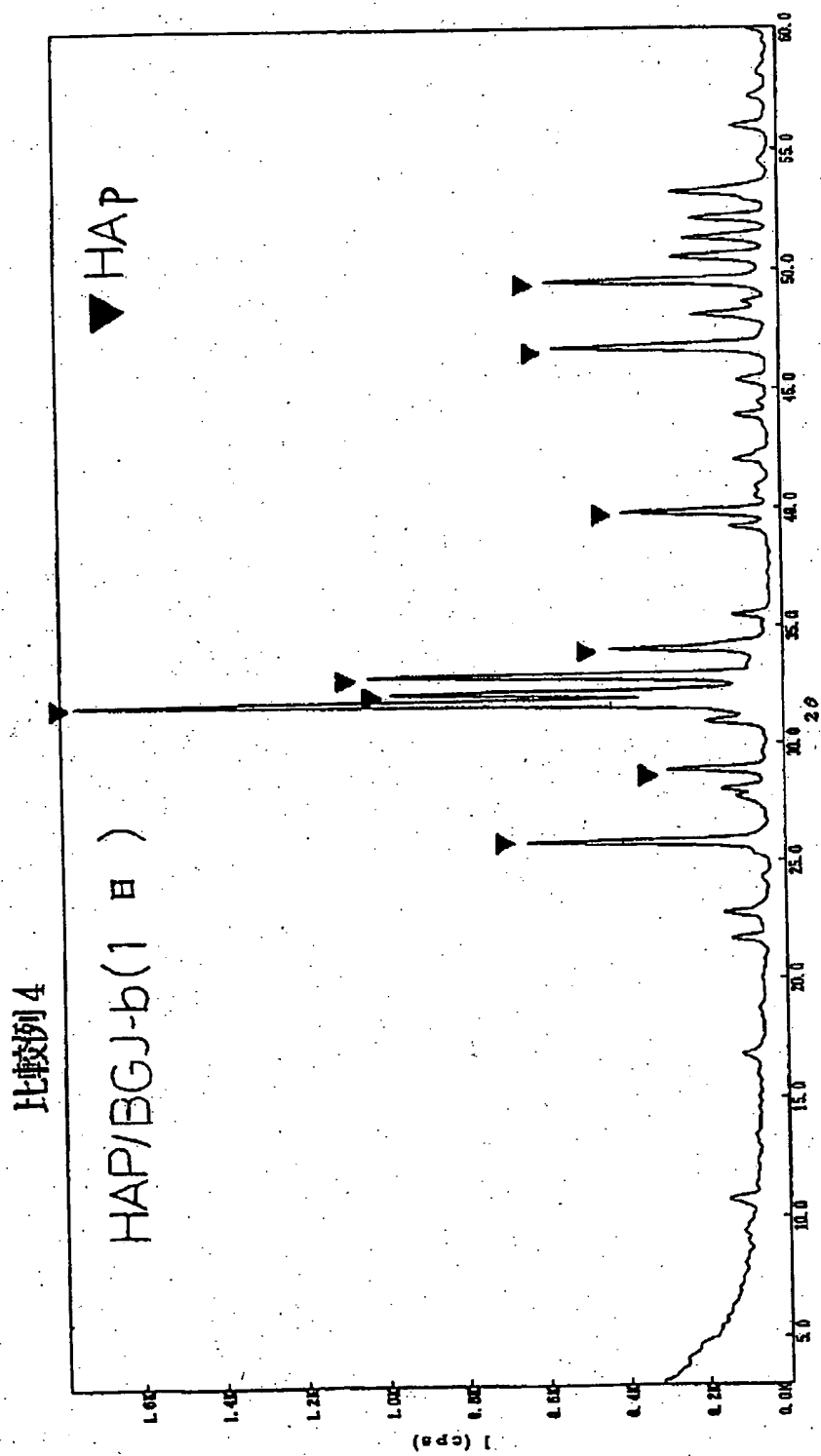
【図23】



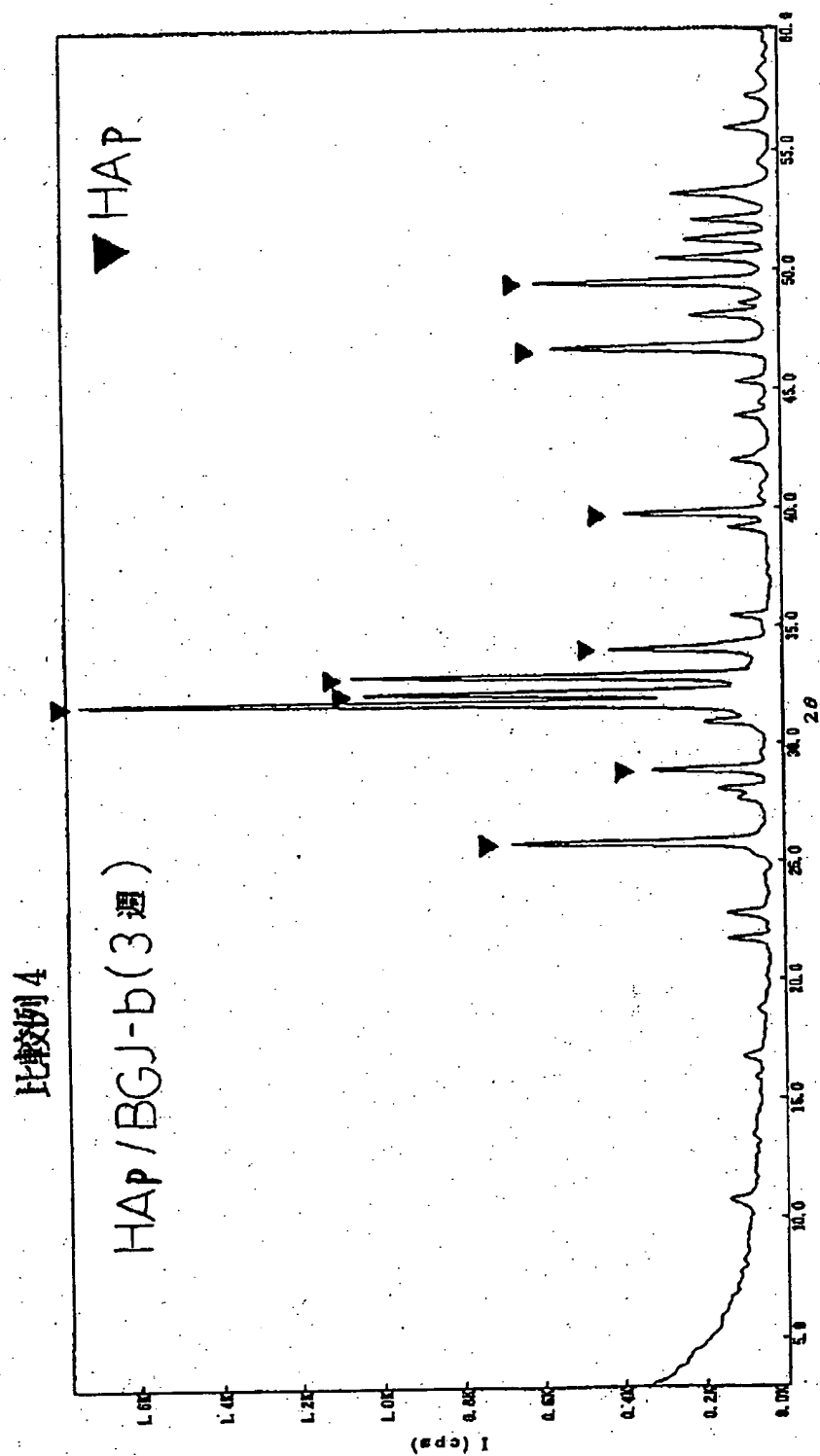
【図24】



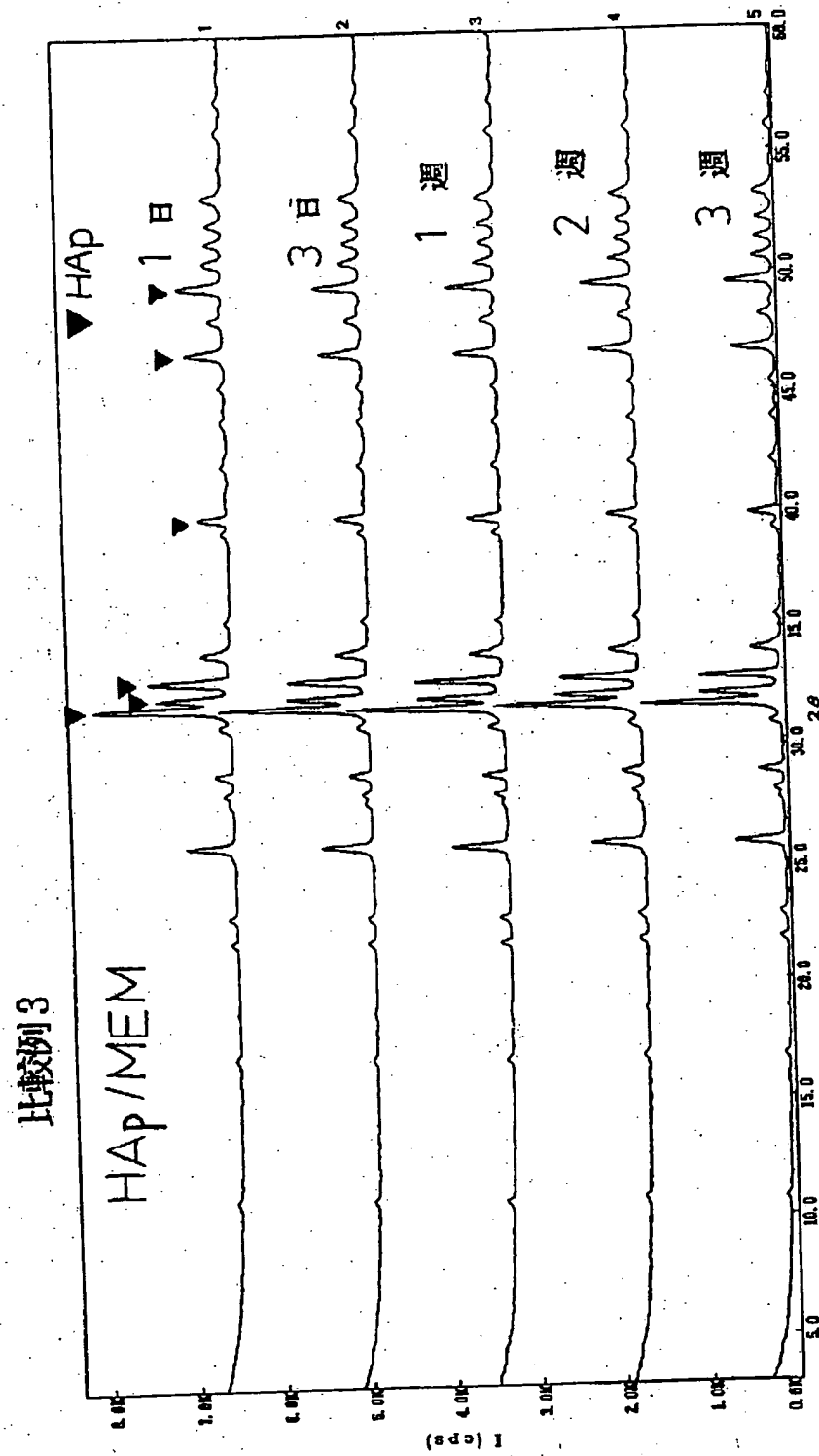
【図25】



【図26】



【図 27】



フロントページの続き

(72)発明者 杉原 富人
大阪府八尾市二俣 2 丁目 22 番地 新田ゼ
ラチン株式会社大阪工場内

(72)発明者 萬代 佳宣
大阪府八尾市二俣 2 丁目 22 番地 新田ゼ
ラチン株式会社大阪工場内

(72)発明者 永富 功治
大阪府八尾市二俣 2 丁目 22 番地 新田ゼ
ラチン株式会社大阪工場内

(56)参考文献 特開 昭 63-229058 (J P, A)
特開 平 1-207072 (J P, A)
特開 平 1-166763 (J P, A)
特開 平 1-166762 (J P, A)
国際公開 90/1341 (W O, A 1)

***NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

(57) [Claim(s)]

[Claim 1] Collagen-calcium phosphate composite material characterized by coming to blend the calcium phosphate compound which is the composite material containing a collagen and has at least one sort of chemistry activity chosen from the group which consists of phosphoric-acid 4 calcium and phosphoric-acid 8 calcium, and the phosphoric-acid ion source.

[Claim 2] A collagen and collagen-calcium phosphate composite material according to claim 1 whose weight ratio of a calcium phosphate compound which has chemistry activity is collagen:calcium phosphate compound =99.9:0.1-0.7:99.3.

[Claim 3] Collagen-calcium phosphate composite material according to claim 1 or 2 with which it comes to blend the cross linking agent of a polyphenol system.

[Claim 4] Adhesives for living bodies with which a composite material given in either to claims 1-3 comes to add gelatin and resorcinol.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the collagen-calcium phosphate composite material used as the anagenesis film (GTR film) in the periodontium, a hemostat, bone supplementation material, cartilage supplementation material, three-dimensions culture-medium material of a hard tissue cell, etc., and its application.

[0002]

[Description of the Prior Art] Conventionally, the ingredients (for example, collagen film etc.) over which the collagen was made to construct a bridge by the cross linking agent of a polyphenol system are used as the GTR film or bone supplementation material. Since a collagen originates in a living body, these ingredients are excellent in biocompatibility or flexibility. However, this ingredient was able to promote neither an organization nor bony restoration.

[0003] Moreover, although the colla tempestade - gene film, the floc, or a fibrin paste was conventionally used as a hemostat, the hard tissue of the hemostasis effectiveness and subsequent hard-tissue restoration was especially inadequate. On the other hand, the calcium phosphate compound which has chemistry activity, such as alpha-tricalcium phosphate (it is hereafter described as alpha-TCP), phosphoric-acid 4 calcium (it is hereafter described as TeCP), and phosphoric-acid 8 calcium (it is hereafter described as OCP), is gradually converted in the living body and in the oral cavity to the hydroxyapatite (it is hereafter described as HAp) and the carbonic acid apatite (it is hereafter described as CO3-Ap) which are the principal component of the living body hard tissue, and may be united with the living body hard tissue. However, only with the calcium phosphate compound which has chemistry activity, deficiently, molding is difficult for flexibility and the hemostasis effectiveness does not have it in it the top where the suitable supplementation to the affected part is difficult, either.

[0004] Then, if the calcium phosphate compound which has the above-mentioned chemistry activity is chemically combined with the ingredient using the collagen as a main raw material, there are flexibility and moldability and the collagen ingredient which can promote an organization and bony restoration can be obtained. By the way, there were a fibrin paste, gelatin-resorcinol-formaldehyde adhesives (GRF), etc. as adhesives for living bodies. However, a fibrin paste has a weak adhesive property, although biocompatibility is high. On the other hand, although the adhesive property of GRF adhesives was strong, its biocompatibility was low and they might cause the inflammation of the affected part, and **** of a cell.

[0005] The ingredient which combined with the ingredient using the above-mentioned collagen as a main raw material chemically the calcium phosphate compound which has chemistry activity is suitable also for the application as a hemostat and adhesives for living bodies.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Therefore, as for this invention, it is possible for calcium phosphate to be chemically compound-ized by the ingredient containing a collagen, and it makes it a technical problem to offer the composite material which combines the compatibility to a living body and flexibility, and a bone and an organization restoration function, and its application.

[0007]

[Means for Solving the Problem] In order to solve the above-mentioned technical problem, the collagen-calcium phosphate composite material concerning this invention is the composite material containing a collagen, and is characterized by coming to blend the phosphoric-acid ion source with the calcium phosphate compound which has chemistry activity. As a collagen used for this invention, although especially limitation is not carried out, it is desirable to use atelocollagen. By enzyme processing, TEROPEPUTAIDO of a molecule end is a part or the collagen all removed, and atelocollagen does not have noxiousness. A collagen may be used as a solution and may be used in the state of powder.

[0008] The collagen concentration of a collagen solution has 0.2 - 2.0% of desirable range. If it exceeds this range, viscosity will be too high, providing as a solution will become difficult, and if less, the effectiveness which it is too thin and a collagen has will not be demonstrated. When using a collagen in the state of powder, it is desirable that 32 micrometers or less of mean particle diameter are 10 micrometers or less preferably. If mean particle diameter becomes large, the dissolution into a reaction solution will become difficult and it will become impossible to homogeneity distribute [of a collagen] it.

[0009] The phosphoric-acid ion source is blended in this invention. This is usually added in the form of a water solution. In the case of compound-izing, the phosphoric-acid ion source helps the crystal growth of the calcium phosphate compound which has chemistry activity, and promotes OCP, the calcium deficit HAp, and generation of CO₃-Ap. The first potassium phosphate, sodium diphosphate, etc. are mentioned as a source of supply of phosphoric-acid ion. As for the mol concentration of the phosphoric-acid ion in a water solution, 2/1-1/30M are desirable. The crystal growth of calcium phosphate is delayed for this range in case of low concentration as above-mentioned, and deposit precipitate is carried out in case of high concentration, without the first potassium phosphate, sodium diphosphate, etc. dissolving. Moreover, the buffer solution and the culture medium containing phosphoric-acid ion (for example, an MEM culture-medium solution, a BGJ-b culture-medium solution, etc.) may be added.

[0010] As a calcium phosphate compound which has the chemistry activity used for this invention, alpha-tricalcium phosphate (it is hereafter described as alpha-TCP), phosphoric-acid 4 calcium (it is hereafter described as TeCP), phosphoric-acid 8 calcium (it is hereafter described as OCP), etc. are mentioned. The calcium phosphate compound which has the above-mentioned chemistry activity may be used independently, or may use two or more sorts together. These are good to use in the state of powder. As for the amount used, it is desirable that the weight ratio in the composite material after desiccation is collagen:calcium phosphate compound =99.9:0.1-0.7:99.3. If the amount of calcium phosphate compounds exceeds this, good compound-ization with a collagen will not be performed.

[0011] In this invention, the cross linking agent of a polyphenol system may be blended further. A bridge is constructed over a collagen by the cross linking agent. As a cross linking agent, the cross linking agent of a polyphenol system is desirable, and a tannic acid, a lignin, etc. are desirable especially. A tannic acid and a lignin are living body related substances, and it is because it does not have noxiousness. 0.05 - 5% of the amount of the cross linking agent used is desirable to a collagen. If it exceeds this range, a bridge is constructed strongly partially and gelation of a collagen may be checked conversely.

[0012] In this invention, if the need is accepted, an ascorbic acid may be added. An ascorbic acid shows a vitamin-C operation in the living body, activates composition of a collagen, and promotes cell proliferation. In addition, to the composite material of this invention, anticancer agents, such as antibiotics, such as a tetracycline, and cisplatin, b-FGF, TGF-beta super families and those DNA or a cell growth factor, a bioactive factor, etc. may be added.

[0013] The composite material of this invention dries the composite to which the above-mentioned component was made to react, and is obtained. An air dried may be carried out using a solvent harmless to living bodies, such as ethanol, or you may make it freeze-dry. Moreover, as for the adhesives for living bodies concerning this invention, a composite material according to claim 1 comes to add gelatin and resorcinol.

[0014] The reinforcement after hardening can be raised by adding gelatin. Moreover, the carboxyl group of gelatin is attached to an apatite and a biopolymer compound carbonizing acid apatite (it is only hereafter described as CO3-Ap) generates. This CO3-Ap can replace a body tissue completely. As gelatin used for this invention, although the method gelatin of a station, gelatin 21 (Nitta gelatin company make), etc. are mentioned, especially pyrogen free gelatin is desirable. Pyrogen free gelatin is because there is little harmfulness to a living body. Here, pyrogen free gelatin is gelatin which removed pyrogen, such as bacterial endotoxin (giant-molecule lipopolysaccharide). After pyrogen free gelatin hydrolyzes the approach (refer to U.S. Pat. No. 4374063) and gelatin which extract gelatin after it carries out alkali treatment of the ossein or the skin which is the raw material of gelatin and pyrogen free water washes, it can be obtained by the approach (refer to JP,56-68607,A) of making ultrafiltration membrane penetrating and removing a pyrogen a ** exception etc.

[0015] As it is, you may add in the state of powder, and above-mentioned gelatin may be used as a solution. Especially an addition is not limited. In this invention, resorcinol acts as an adhesion component. Noxiousness of resorcinol is low. 0.1 - 20% (weight ratio) of an addition is desirable. If it becomes high concentration more than this, it will become impossible to disregard noxiousness, the elasticity of the adhesives after bridge formation will fall, operability will worsen, and it will become easy to separate from an application site.

[0016]

[Function] The collagen-calcium phosphate composite material concerning this invention is excellent in biocompatibility or flexibility in order to make the collagen which constitutes the living body hard tissue the charge of a principal member. Furthermore, since the calcium phosphate which has chemistry activity is blended with this, it permutes by the body tissue with time. CO3- whose calcium phosphate which has chemistry activity is the principal component of the living body hard tissue in connection with a hydrolysis reaction — it is because Ap and OCP are compounded.

[0017] Moreover, since the collagen which has gelation energy is made to carry out a hydrolysis reaction and is made to compound-ize the calcium phosphate which has crystal inversion energy, both effectiveness can be acquired good. The calcium phosphate which has chemistry activity carries out crystal inversion by the phase transition reaction with time on a crystal interface by performing a hydrolysis reaction in the water solution containing phosphoric-acid ion. It sets to this crystal inversion, and OCP of a metastable phase generates and grows in a neutral pH field. This OCP forms the composite between layers by conjugating with the sol → gel phase transition reaction of the collagen which has a carboxyl group.

[0018] the adhesives for living bodies concerning this invention — the account of a top — since it comes to add gelatin and resorcinol to the composite material of this invention, high moreover, biocompatibility has a high adhesive property.

[0019]

[Example] Although the example of this invention is shown below, this invention is not limited to the following example.

– To the phosphate buffer solution (pH7) which performed example 1-sterile filtration (0.45 micrometers), OCP which carried out ultraviolet-rays sterilization was added at a rate of OCP/phosphate buffer solution = 0.25g / 10ml, and was stirred for 1 hour. Next, 0.3% water solution (pH3) of collagen-IP (cel matrix-IP: Nitta gelatin company make) which carried out ultraviolet-rays sterilization was mixed by the ratio of phosphate buffer solution:collagen solution = 1:1, and it stirred for 5 minutes. The obtained composite is poured distributively to a multi-plate and it is CO2. It was left for one week on the 3rd on the 1st in the incubator (37 degrees C, 2 = 5% of COs). These were formalin-processed and 100% ethanol processed 10% in order to analyze crystal inversion and crystal growth, and it was air-dry, and composite material was obtained.

[0020] – It was made to be the same as that of an example 1 except having used the phosphate buffer solution which added the example 2-tannic acid 0.2% (W/V).

– Instead of example 3-OCP, alpha-TCP which sterilized by hot air 150 degrees C was made to be the same as that of an example 1 except having added at a rate of alpha-TCP / phosphate buffer solution = 1g / 10ml.

[0021] - Instead of example 4-OCP, alpha-TCP which sterilized by hot air 150 degrees C was made to be the same as that of an example 2 except having added at a rate of alpha-TCP / phosphate buffer solution = 1g / 10ml.

- It was made to be the same as that of an example 3 except having used HAp which sterilized by hot air 150 degrees C instead of example of comparison 1-alpha-TCP.

[0022] - It was made to be the same as that of an example 4 except having used HAp which sterilized by hot air 150 degrees C instead of example of comparison 2-alpha-TCP. Observation of gelation, freeze drying, and the following physical-properties measurement were performed about examples 1-4 and the examples 1 and 2 of a comparison. The result was shown in Table 1 and drawing 1-5.

[Measuring method]

(1) pH of the gel compound ghost extracted for every pH measurement predetermined time was measured using the pH meter.

(2) X-ray diffraction profit **** composite material was identified using powder X-ray diffraction equipment (MXP3, Mac Saiensu-Sha make).

(3) the front face was observed for scanning transmission electron microscope profit **** composite material with the scanning electron microscope (a CS-2100A mold, Hitachi Make).

[0023]

[Table 1]

		実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	比較例 1	比較例 2
リン酸カルシウム		OCP	OCP	α -TCP	α -TCP	HAp	HAp
タンニン酸		—	含有	—	含有	—	含有
ゲル化注	1 日後	有り (3)	ゲル状沈殿	有り (2)	ゲル状沈殿	有り (1)	ゲル状沈殿
	3 日後	有り (2)	ゲル状沈殿	有り (2)	ゲル状沈殿	有り (1)	ゲル状沈殿
	1 週間後	有り (2)	ゲル状沈殿	有り (2)	ゲル状沈殿	有り (1)	ゲル状沈殿

(注) ゲル化有りの場合、括弧内は硬さを表す。ゲルの硬さ：(1) > (2) > (3)
ゲル状沈殿の場合、沈殿量は少量である。

[0024] 1. By the system which does not add a tannic acid, good gelation is shown in early stages and increase and crystal generation are performed in hardness with time so that it may see to the gelation table 1. On the other hand, by the system which added the tannic acid, gel precipitate arises and uniform gelation of a compound ghost is checked rather.

2. Although pH measurement drawing 1 was a system which does not add a tannic acid and drawing 2 was the system which added the tannic acid, the inclination for all to settle down near neutrality with time as for pH was seen so that it might see to **'s and others drawing.

3. By the system (examples 3 and 4) using alpha-TCP, the crystal inversion to an apatite was started forming OCP 1 or 3 days after, and it has permuted to the apatite completely after about one week so that it may see to X diffraction drawing 4. Composition of an apatite is checked, although it is [some] also by the system (examples 1 and 2) using OCP so that it may see to drawing 3. These apatites are considered that the part is a carbonic acid apatite. In the example of a comparison, most crystal inversion was not checked so that it might see to drawing 5 R> 5.

4. By the system (examples 1 and 2) of a scanning transmission electron microscope OCP, after one day, it is covered as the shape of a piece of phosphorus, and a scale-shaped crystal almost extensively, and the host crystal front face is comparatively flat. When it becomes after three days and one week, a granularity crystal comes to be conspicuous on a host crystal front face. The difference arising from the existence of tannic-acid content was not observed.

[0025] Among the systems using alpha-TCP, by tannic-acid a non-containing system, (an example 3) and the structure in which granularity was ready are observed, and it is thought that composite material is constituted from a matrix by a tangle and collagen of crystals which were

generated. Moreover, after [of a tannic-acid content system (example 4)] three days, the petaloid crystal structure which shows typical OCP generation is observed, and the crystal inversion to OCP is imagined.

[0026] Crystal growth was not observed in the example of a comparison. 5. The compound ghost was freeze-dried in each example and the example of a comparison. By the tannic-acid content system, there was a dry feeling and it had time amount in desiccation. On the other hand, in the tannic-acid additive-free thing, it became the floc which has good flexibility altogether.

- 0.3% water solution (pH3), the 10 times many MEM culture-medium [as this] concentration solution, and the buffer solution for reconstruction of collagen-IP which carried out example 5-ultraviolet-rays sterilization were mixed at a rate of 8:1:1. Into this mixed liquor, OCP dry-heated 150 degrees C was added at a rate of OCP/mixed liquor = 0.5g / 10ml, and was stirred for 1 hour. The obtained composite is poured distributively to a multi-plate and it is CO2. It was left for three weeks for two weeks for one week on the 3rd on the 1st in the incubator (37 degrees C, 2 = 5% of COs). These were formalin-processed and 100% ethanol processed 10% in order to analyze crystal inversion and crystal growth, and it was air-dry, and composite material was obtained.

[0027] - Example 6-mixed liquor was made to be the same as that of an example 5 except having mixed 0.3% water solution (pH3), the 5 times many BGJ-b culture-medium [as this] concentration solution, and the buffer solution for reconstruction of collagen-IP which carried out ultraviolet-rays sterilization at a rate of 7:2:1.

- It was made to be the same as that of an example 5 except having used alpha-TCP which sterilized by hot air 150 degrees C instead of example 7-OCP.

[0028] - It was made to be the same as that of an example 6 except having used alpha-TCP which sterilized by hot air 150 degrees C instead of example 8-OCP.

- It was made to be the same as that of an example 5 except having used TeCP which sterilized by hot air 150 degrees C instead of example 9-OCP.

[0029] - It was made to be the same as that of an example 6 except having used TeCP which sterilized by hot air 150 degrees C instead of example 10-OCP.

- It was made to be the same as that of an example 5 except having used HAp which sterilized by hot air 150 degrees C instead of example of comparison 3-OCP.

[0030] - It was made to be the same as that of an example 6 except having used HAp which sterilized by hot air 150 degrees C instead of example of comparison 4-OCP. Above-mentioned physical-properties measurement was performed about examples 5-10 and the examples 3 and 4 of a comparison. The result was shown in drawing 6 -27.

1. In examples 5 and 6 (system using OCP), and the examples 3 and 4 (system using HAp) of a comparison, pH fluctuation is comparatively stable small so that it may see to pH measurement drawing 6 and 7. Although pH changes to an acidity side with time in the examples 7 and 8 (system using alpha-TCP), the range of fluctuation is [the direction of the example 8 using a BGJ-b culture medium] small slightly. Therefore, it is thought that pH fluctuation can be controlled by selection of a suitable culture medium etc. In the examples 9 and 10 (system using TeCP), although pH is changed the first stage, it is stabilized neutrally gradually.

2. By the system (examples 5 and 6) using X diffraction OCP, crystal inversion with time is seldom checked so that it may see to drawing 8 -11, but these are compounding the carbonic acid apatite in part from the first stage, as shown in drawing 12. By the system (examples 7 and 8) using alpha-TCP, crystal inversion with time was checked so that it might see to drawing 13 -16. It has completed from about one to two weeks, and this shift reaction is changing from the carbonic acid apatite to hydroxyapatite with decline of an alpha-TCP peak, as shown in drawing 17. Also by the system (examples 9 and 10) using TeCP, crystal inversion with time was checked so that it might see to drawing 18 -21. As this shift reaction is shown in drawing 22 R> 2, similarly it has completed from about one to two weeks, and from the first stage, hydroxyapatite is compounded and a TeCP peak declines with time. On the other hand, in the example of a comparison, crystal inversion with time was hardly checked so that it might see to drawing 23 -27.

3. By the system (examples 5 and 6) using a scanning transmission electron microscope OCP, a

crystal front face is comparatively flat and a scaly crystal is checked partially. By the system (examples 7 and 8) using alpha-TCP, it turns out that petaloid structure is shown, big granulation is also checked in the long run from beginning to end, and OCP is compounded. It seems that the direction of the example 8 using a BGJ-b culture medium shows big petaloid structure, and the activity of alpha-TCP is high. It seems that moreover, the activity of TeCP is higher for the example 10 using a BGJ-b culture medium by the system (examples 9 and 10) using TeCP like [many granularity crystals detailed on a big granulation front face are observed, and] the system using alpha-TCP. On the other hand, in the example of a comparison, the surface crystal structure did not show change from beginning to end.

[0031] Furthermore, while making and filling up mature rabbit tibia **** with the drilled hole by having made into **** material each three days after [a reaction] formalin freeze-drying object which is not processed [of examples 1-10 and the examples 1-4 of a comparison] and judging the hemostasis effectiveness by viewing, deashing and a non-deashing pathology sample were created for the perimeter section after six weeks of embedding. The result is shown in Table 2.

[0032]

[Table 2]

	止血効果	成熟家兎脛骨部埋入 6 週後の病理観察	
		非脱灰標本	脱灰標本
実施例 1	優良	複合物が新生骨と置換し、海綿骨と連続していた。	複合物内で新生血管を核とし、骨細胞がオステオンを形成。
実施例 2	優良	同上	破骨細胞が複合物内に存在し、骨芽細胞が新生骨形成。
実施例 3	優良	同上	実施例 1 と同じ。
実施例 4	優良	同上	実施例 2 と同じ。
実施例 5	優良	同上	実施例 1 と同じ。
実施例 6	優良	同上	実施例 1 と同じ。
実施例 7	優良	同上	実施例 1 と同じ。
実施例 8	優良	同上	実施例 1 と同じ。
実施例 9	優良	同上	実施例 1 と同じ。
実施例 10	優良	同上	実施例 1 と同じ。
比較例 1	良好	複合物の周辺から骨が侵入していた。	複合物内に新生血管が入っているが、破骨細胞、骨芽細胞少ない。 異物巨細胞が結晶部に存在。
比較例 2	良好	同上	同上
比較例 3	良好	同上	同上
比較例 4	良好	同上	同上

[0033]

[Effect of the Invention] The collagen-calcium phosphate composite material of this invention has high living body activity, and can expect the positive recovery effectiveness. Furthermore, since it excels also in flexibility the top where shaping of a press, cutting, etc. is easy, the restoration to a curved-surface part is also possible. moreover, if the gel object in a hydrolysis reaction process serves as three-dimensions culture-medium material and these are freeze-

dried further, it has good flexibility — it becomes the implant material of the shape of curdy or film.

[0034] Moreover, as for the adhesives for living bodies of this invention, the adhesives itself can promote growth of the self-repair cell instead of a foreign matter for a living body. For this reason, it is suitable for junction of the hemostasis of incision / excision side of various organs, and a blood vessel and an organ, and adhesion of the anastomosis section.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Fluctuation of pH of the composite material of examples 1 and 3 and the example 1 of a comparison with time is shown.

[Drawing 2] Fluctuation of pH of the composite material of examples 2 and 4 and the example 2 of a comparison with time is shown.

[Drawing 3] The chart by the X-ray diffractometer of the composite material of examples 1 and 2 is shown.

[Drawing 4] The chart by the X-ray diffractometer of the composite material of examples 3 and 4 is shown.

[Drawing 5] The chart by the X-ray diffractometer of the composite material of the examples 1 and 2 of a comparison is shown.

[Drawing 6] Fluctuation of pH of the composite material of examples 5, 7, and 9 and the example 3 of a comparison with time is shown.

[Drawing 7] Fluctuation of pH of the composite material of examples 6, 8, and 10 and the example 4 of a comparison with time is shown.

[Drawing 8] The chart by the X-ray diffractometer after one-day progress of the composite material of an example 5 is shown.

[Drawing 9] The chart by the X-ray diffractometer after three-week progress of the composite material of an example 5 is shown.

[Drawing 10] The chart by the X-ray diffractometer after one-day progress of the composite material of an example 6 is shown.

[Drawing 11] The chart by the X-ray diffractometer after three-week progress of the composite material of an example 6 is shown.

[Drawing 12] It is the X diffraction chart which shows a change of the composite material of an example 5 with time.

[Drawing 13] The chart by the X-ray diffractometer after one-day progress of the composite material of an example 7 is shown.

[Drawing 14] The chart by the X-ray diffractometer after three-week progress of the composite material of an example 7 is shown.

[Drawing 15] The chart by the X-ray diffractometer after one-day progress of the composite material of an example 8 is shown.

[Drawing 16] The chart by the X-ray diffractometer after three-week progress of the composite material of an example 8 is shown.

[Drawing 17] It is the X diffraction chart which shows a change of the composite material of an example 7 with time.

[Drawing 18] The chart by the X-ray diffractometer after one-day progress of the composite material of an example 9 is shown.

[Drawing 19] The chart by the X-ray diffractometer after three-week progress of the composite material of an example 9 is shown.

[Drawing 20] The chart by the X-ray diffractometer after one-day progress of the composite material of an example 10 is shown.

[Drawing 21] The chart by the X-ray diffractometer after three-week progress of the composite material of an example 10 is shown.

[Drawing 22] It is the X diffraction chart which shows a change of the composite material of an example 9 with time.

[Drawing 23] The chart by the X-ray diffractometer after one-day progress of the composite material of the example 3 of a comparison is shown.

[Drawing 24] The chart by the X-ray diffractometer after three-week progress of the composite material of the example 3 of a comparison is shown.

[Drawing 25] The chart by the X-ray diffractometer after one-day progress of the composite material of the example 4 of a comparison is shown.

[Drawing 26] The chart by the X-ray diffractometer after three-week progress of the composite material of the example 4 of a comparison is shown.

[Drawing 27] It is the X diffraction chart which shows a change of the composite material of the example 3 of a comparison with time.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

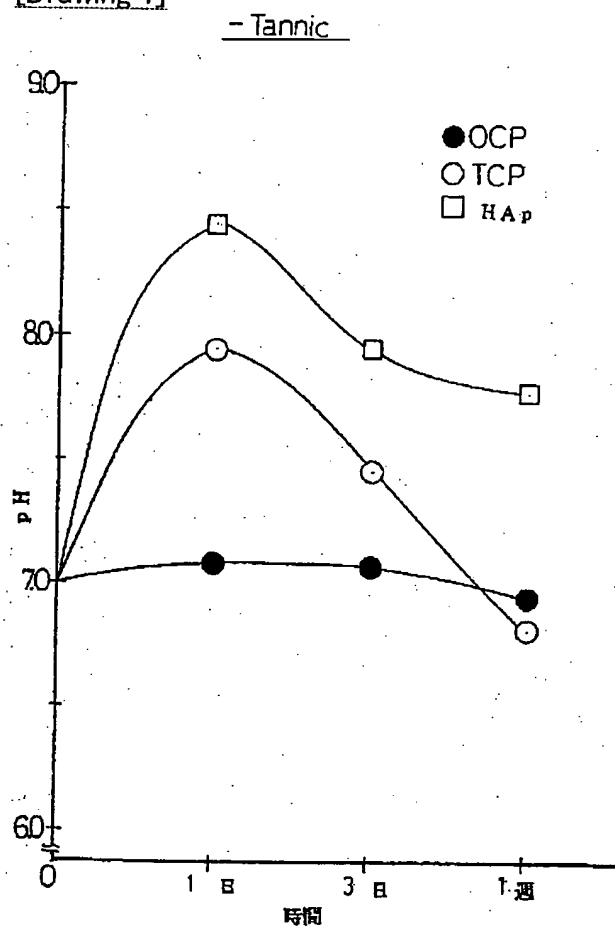
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

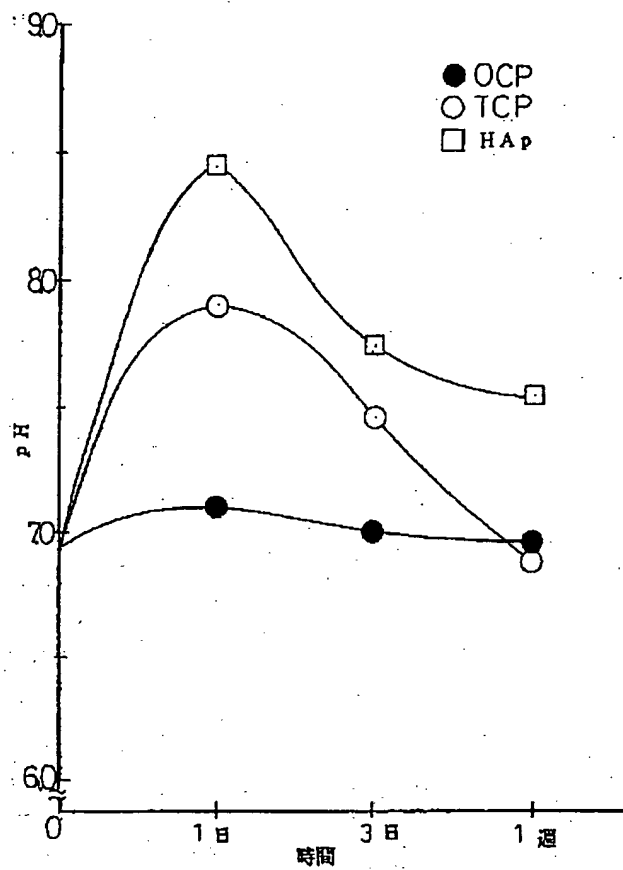
DRAWINGS

[Drawing 1]



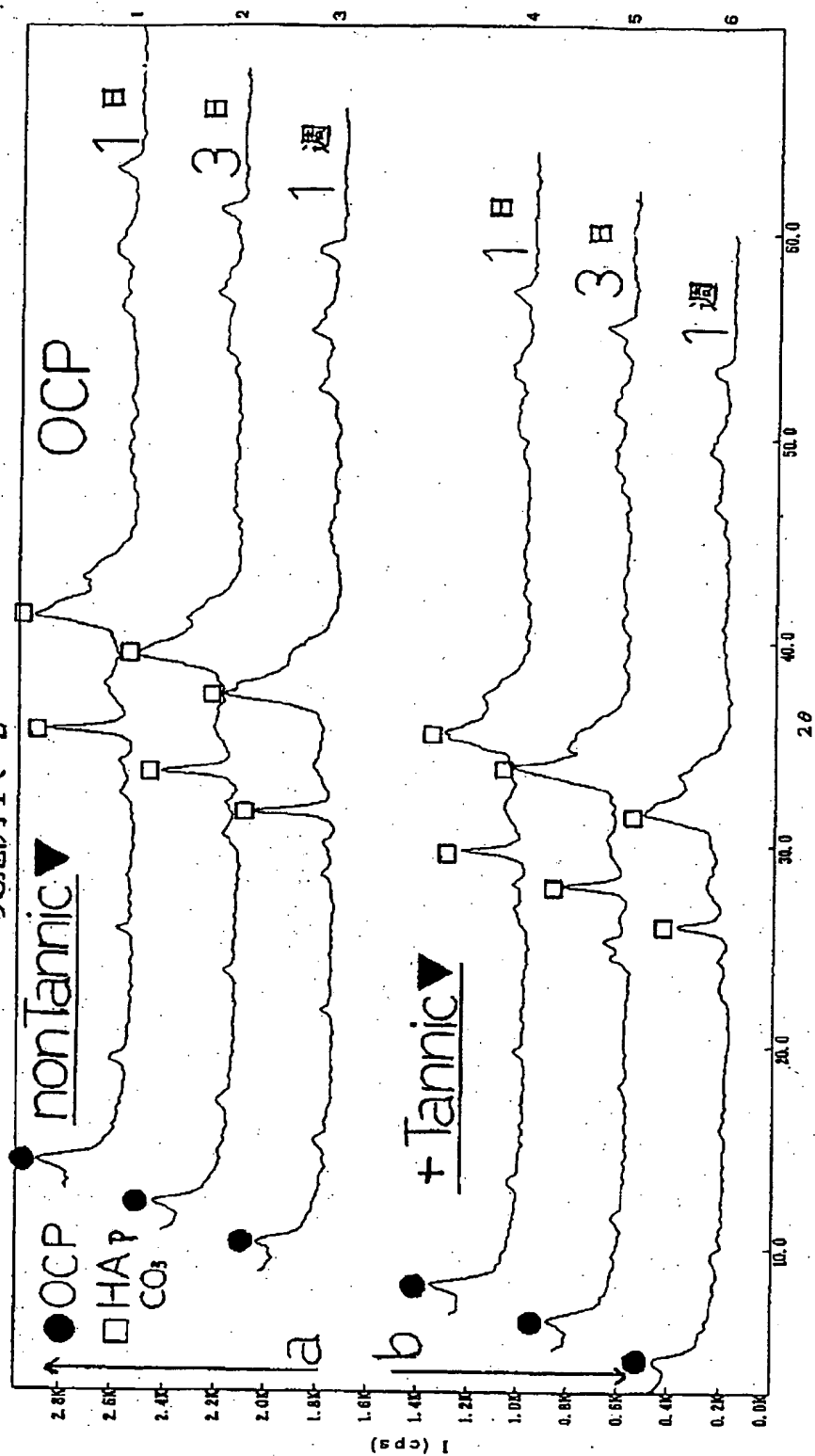
[Drawing 2]

+ Tannic



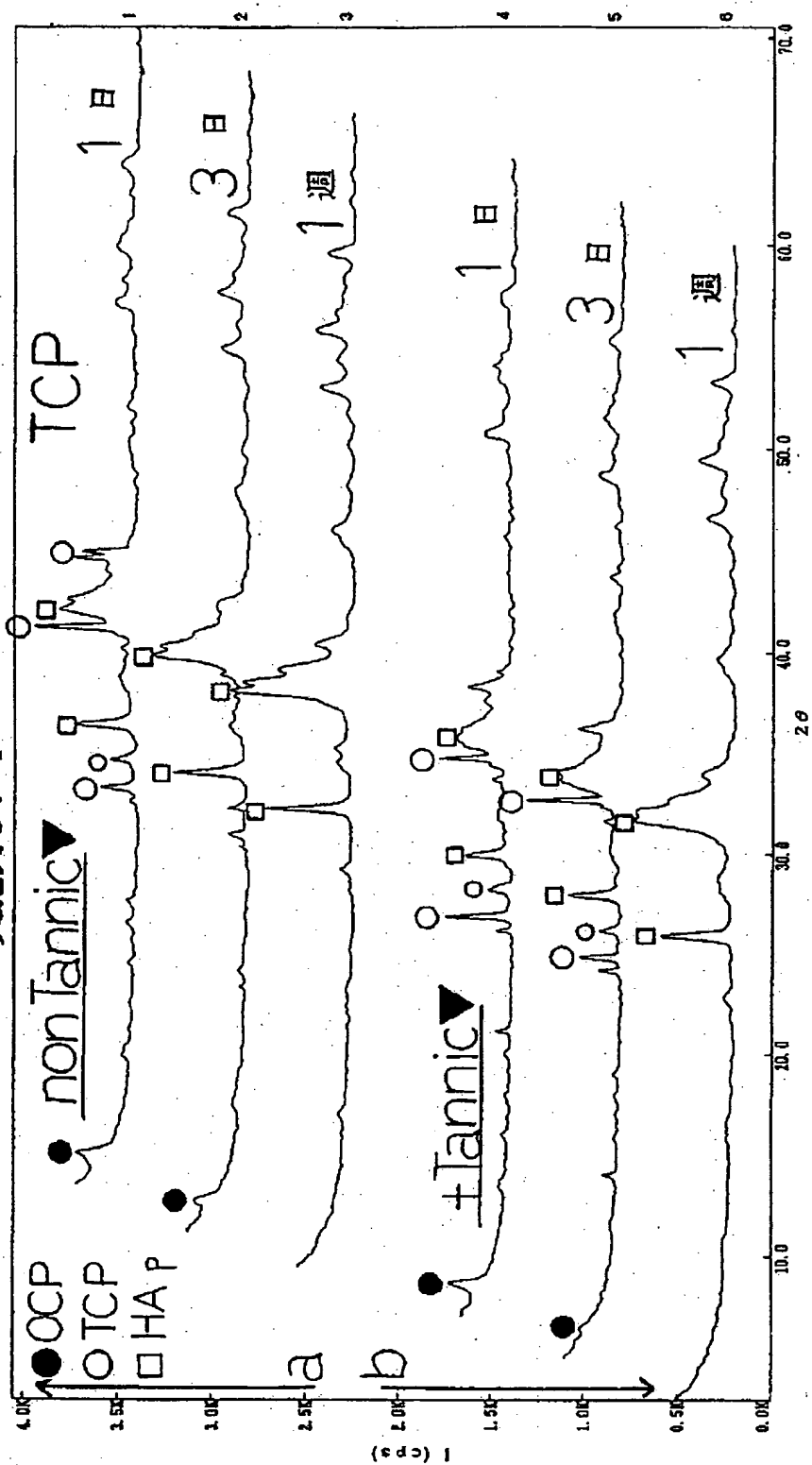
[Drawing 3]

実施例 1、2



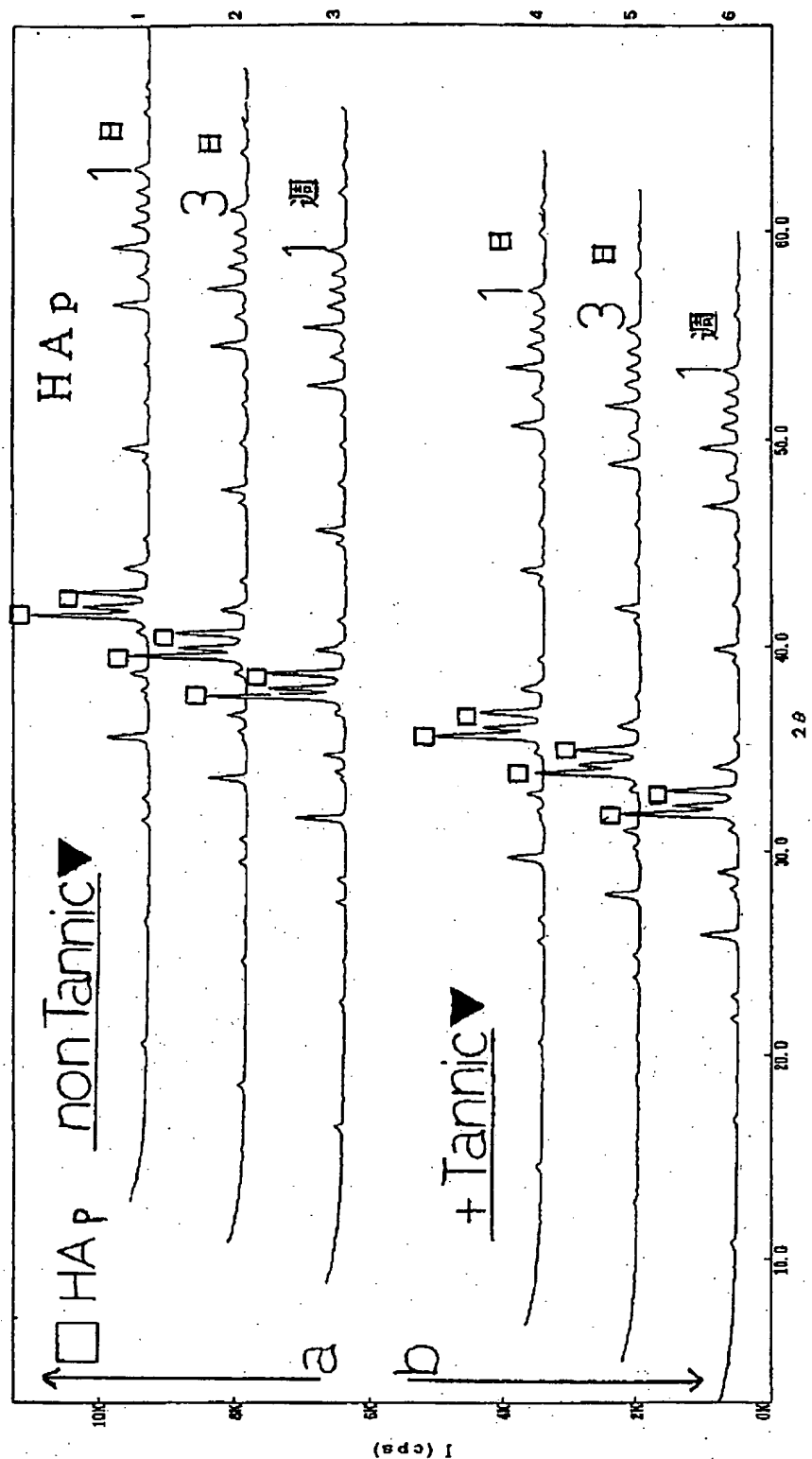
[Drawing 4]

実施例 3、4



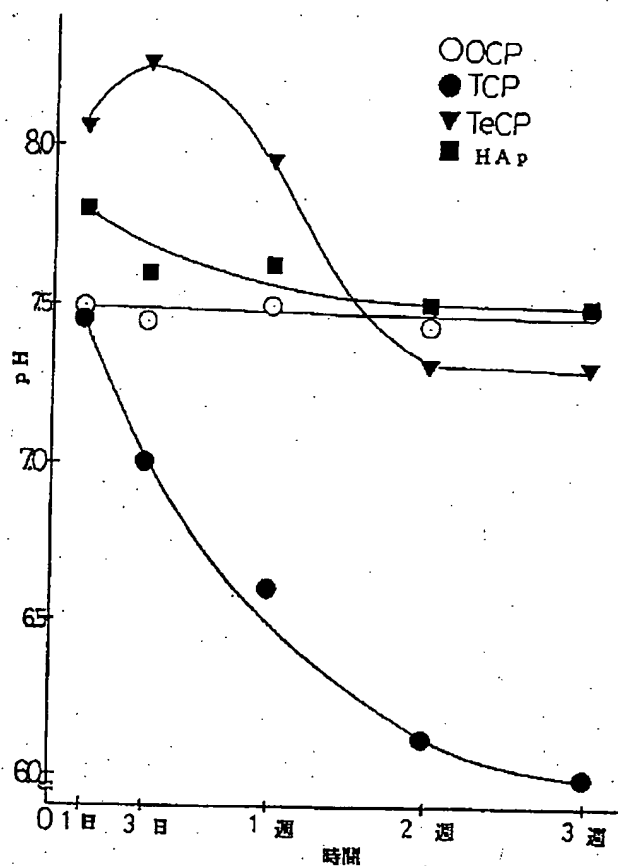
[Drawing 5]

比較例1、2



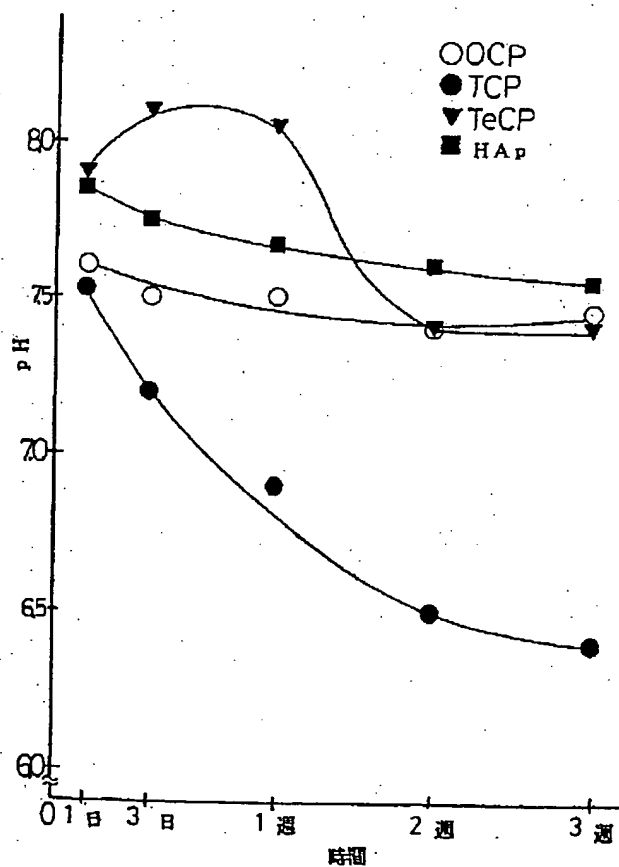
[Drawing 6]

MEM

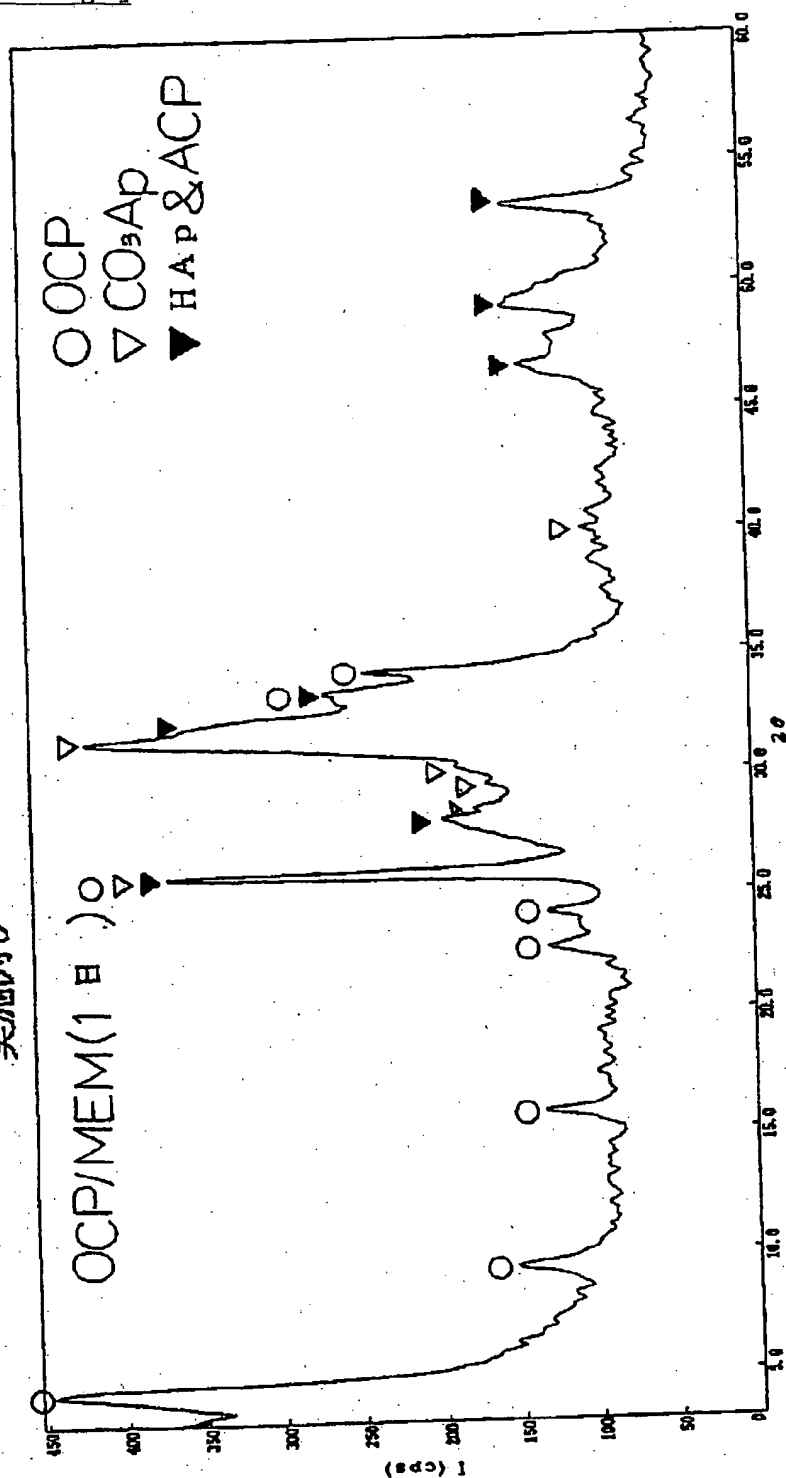


[Drawing 7]

BGI-b



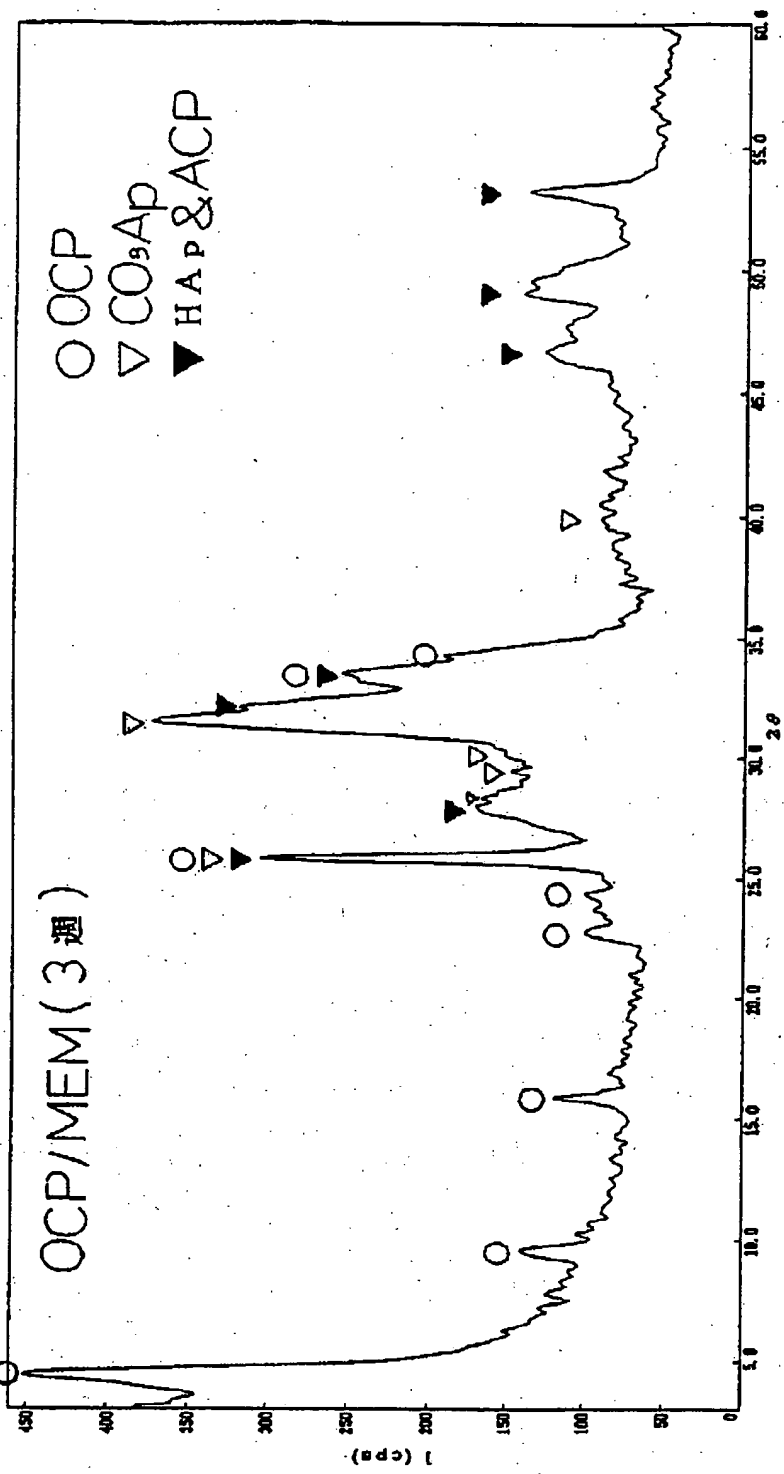
[Drawing 8]



[Drawing 9]

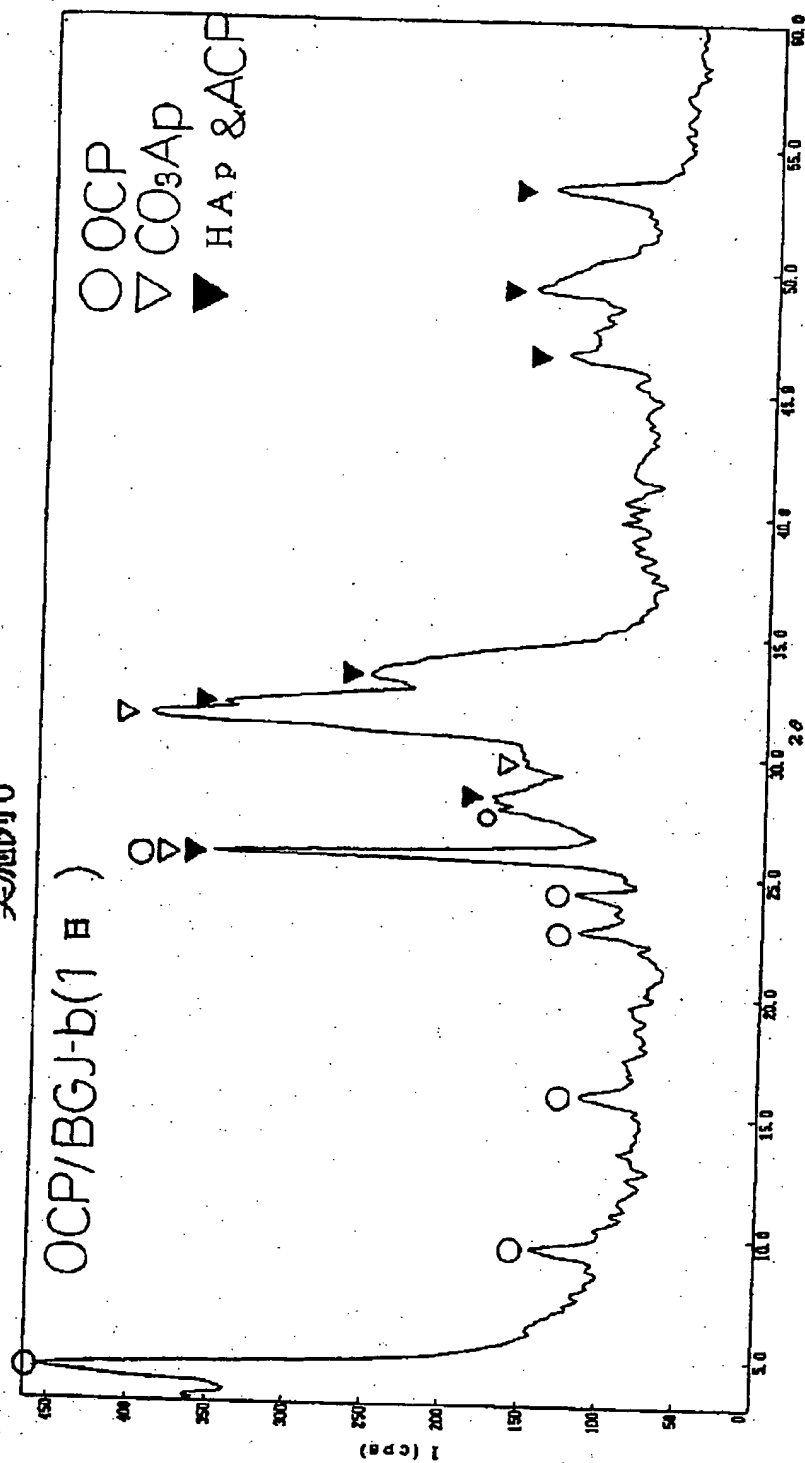
実施例 5

実施例 5



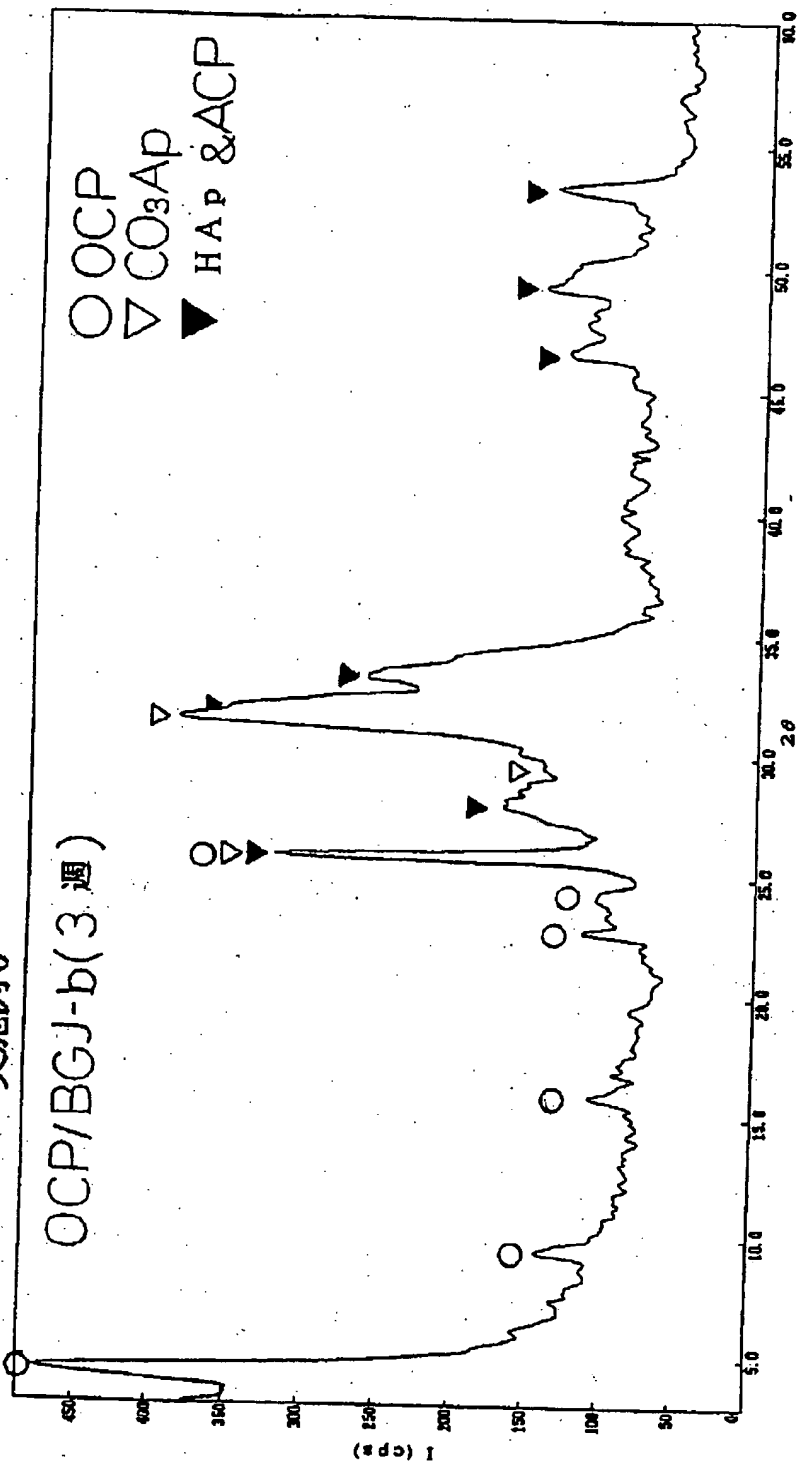
[Drawing 10]

実施例 6



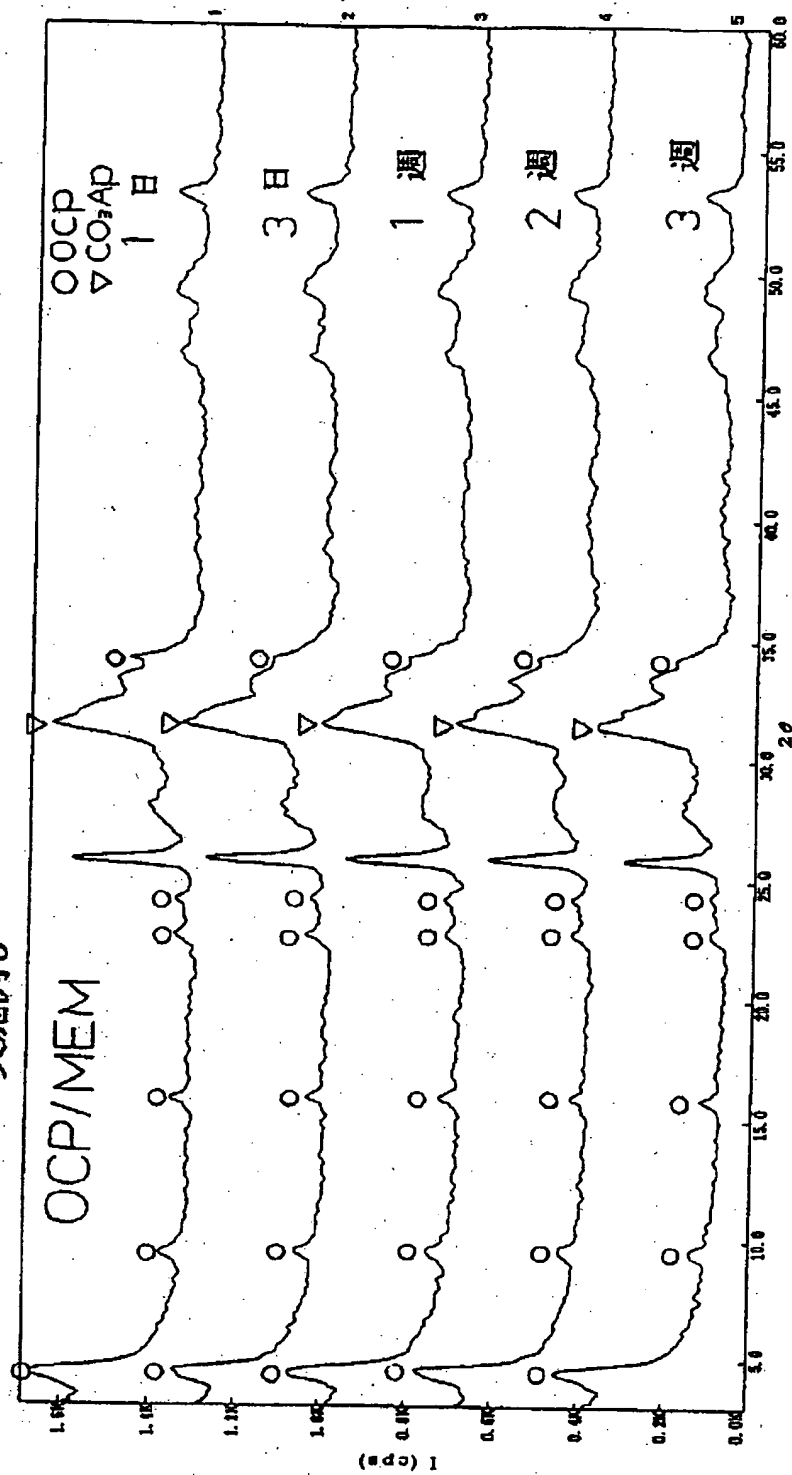
[Drawing 11]

実施例 6



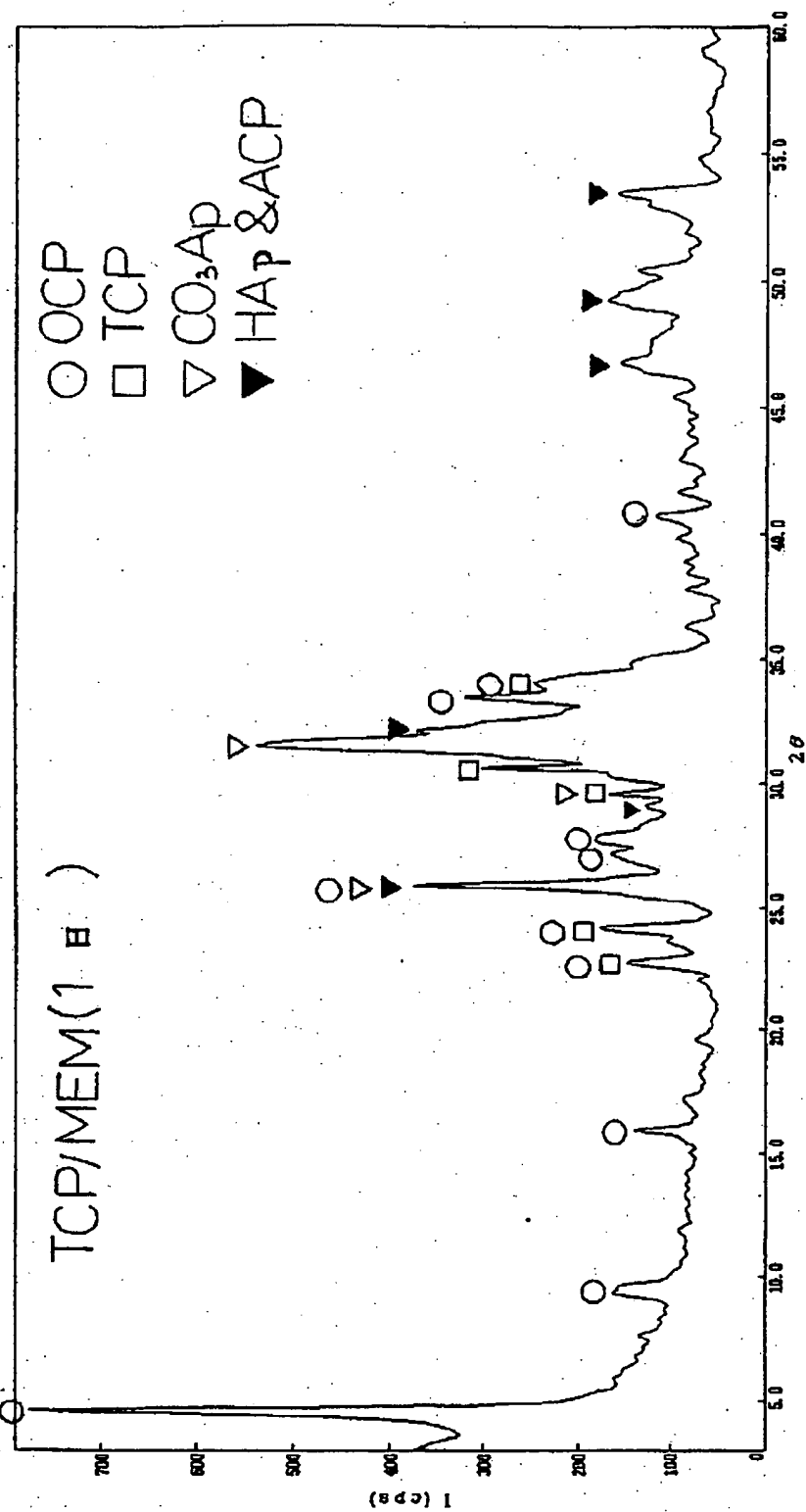
[Drawing 12]

実施例 5



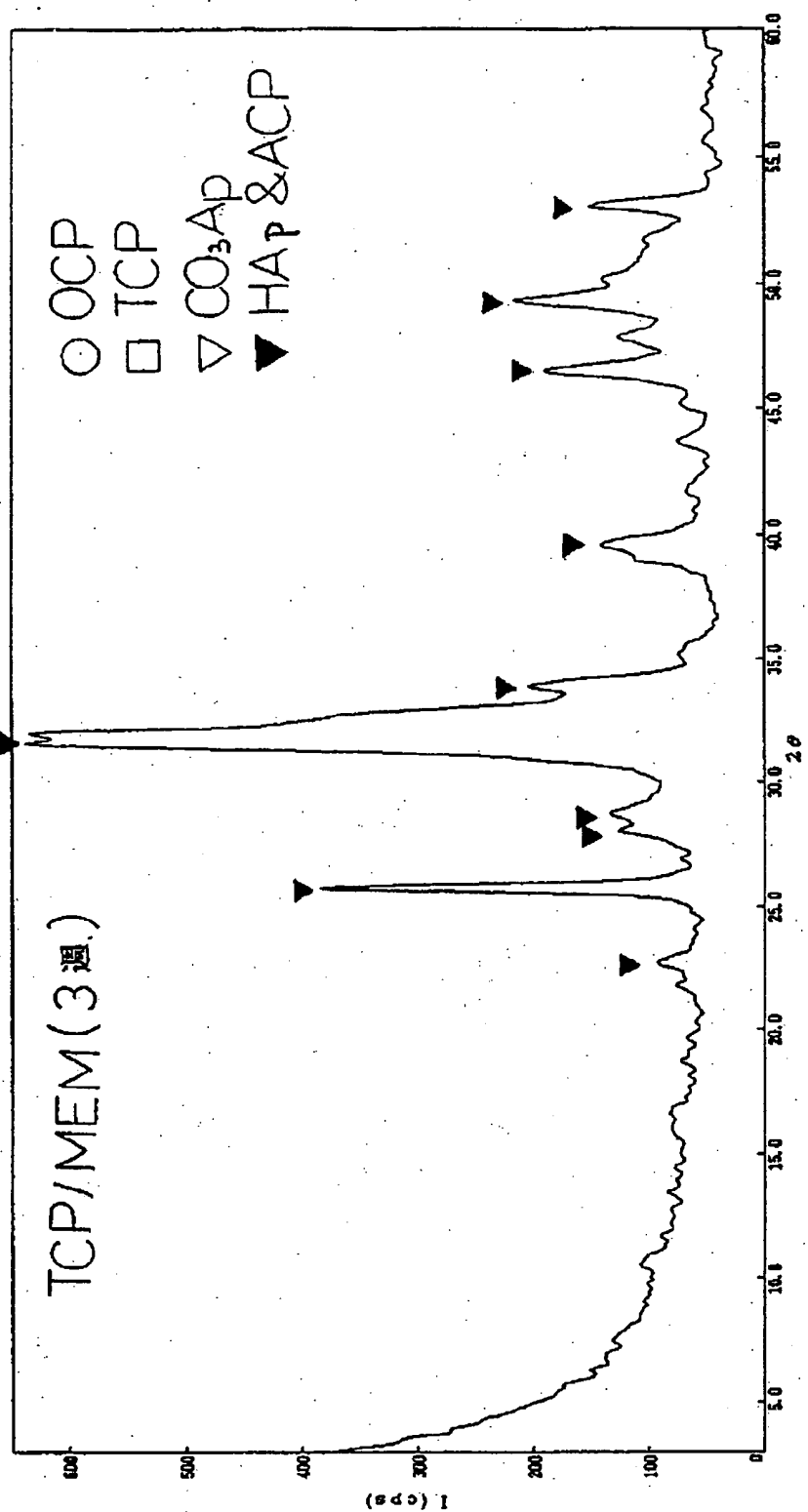
[Drawing 13]

実施例 7



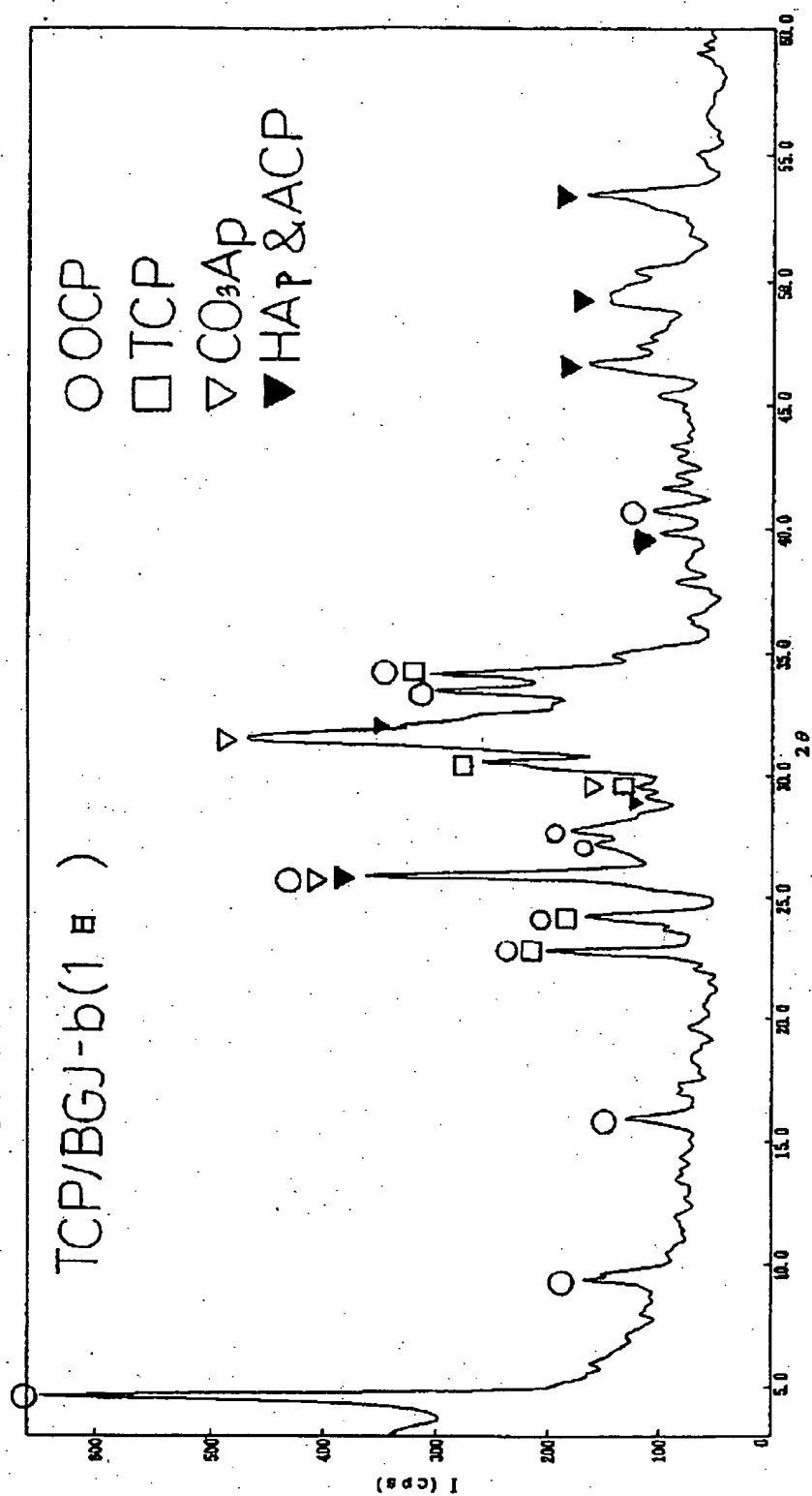
[Drawing 14]

実施例 7



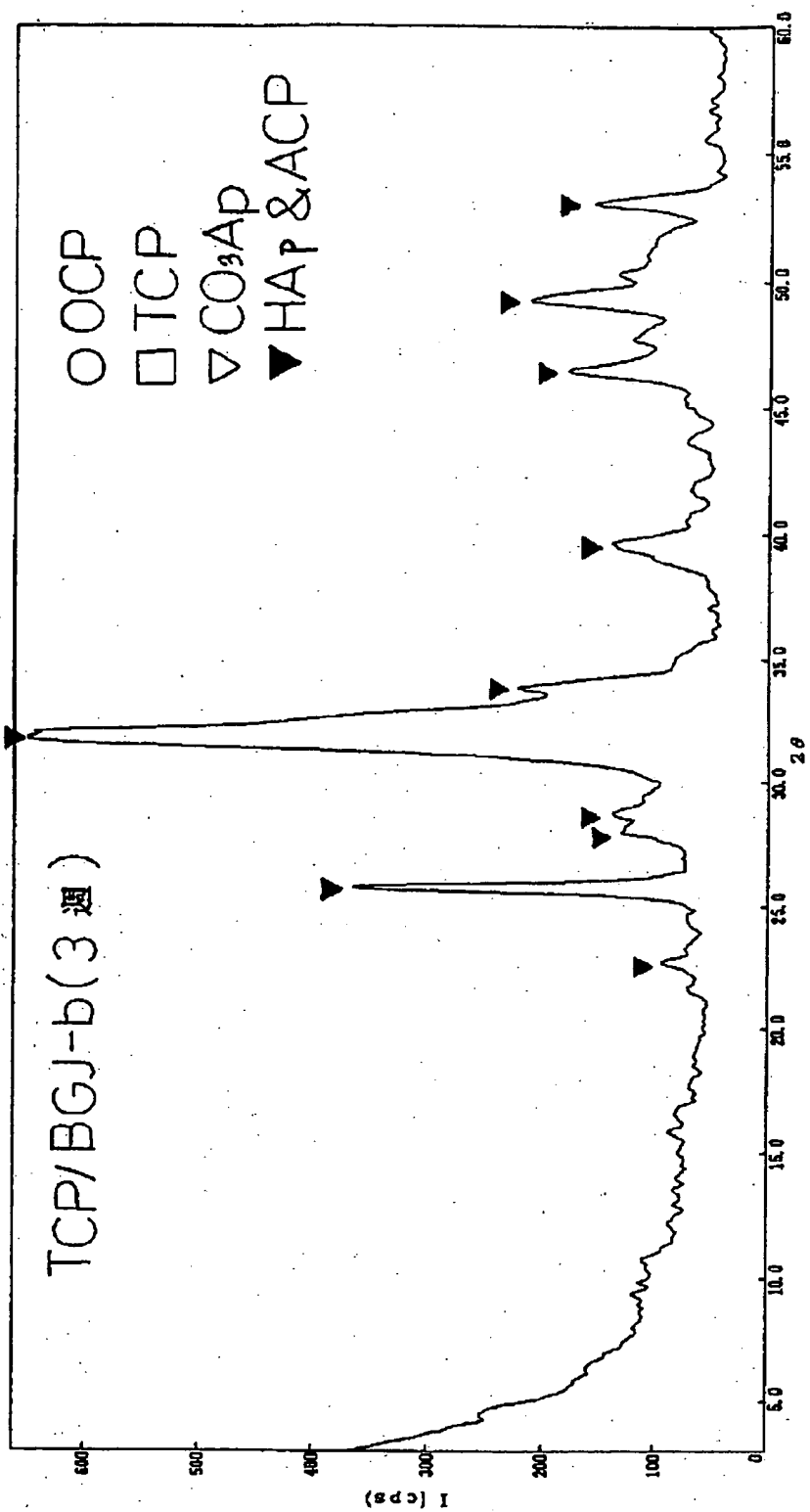
[Drawing 15]

実施例 8



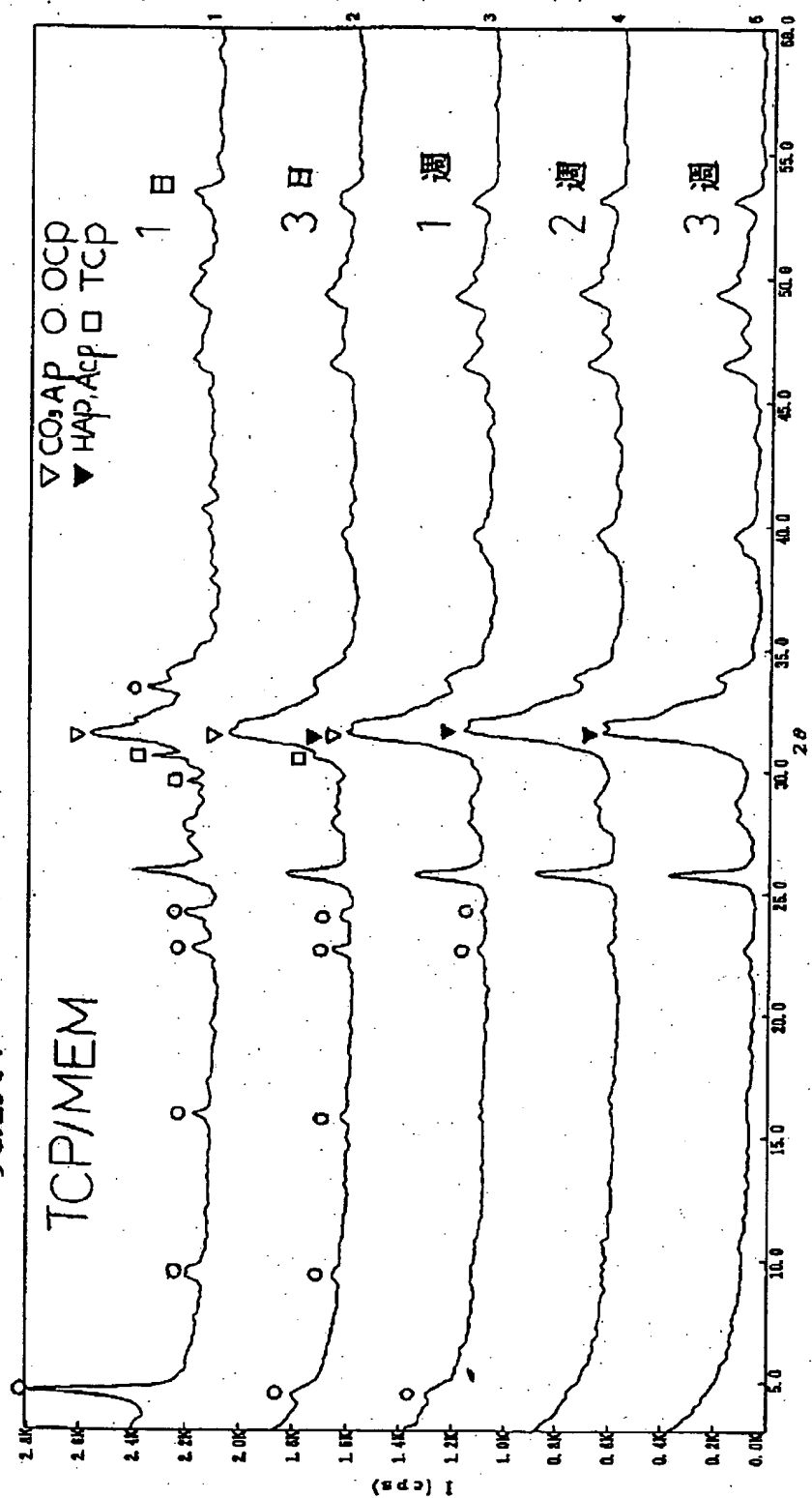
[Drawing 16]

実施例 8



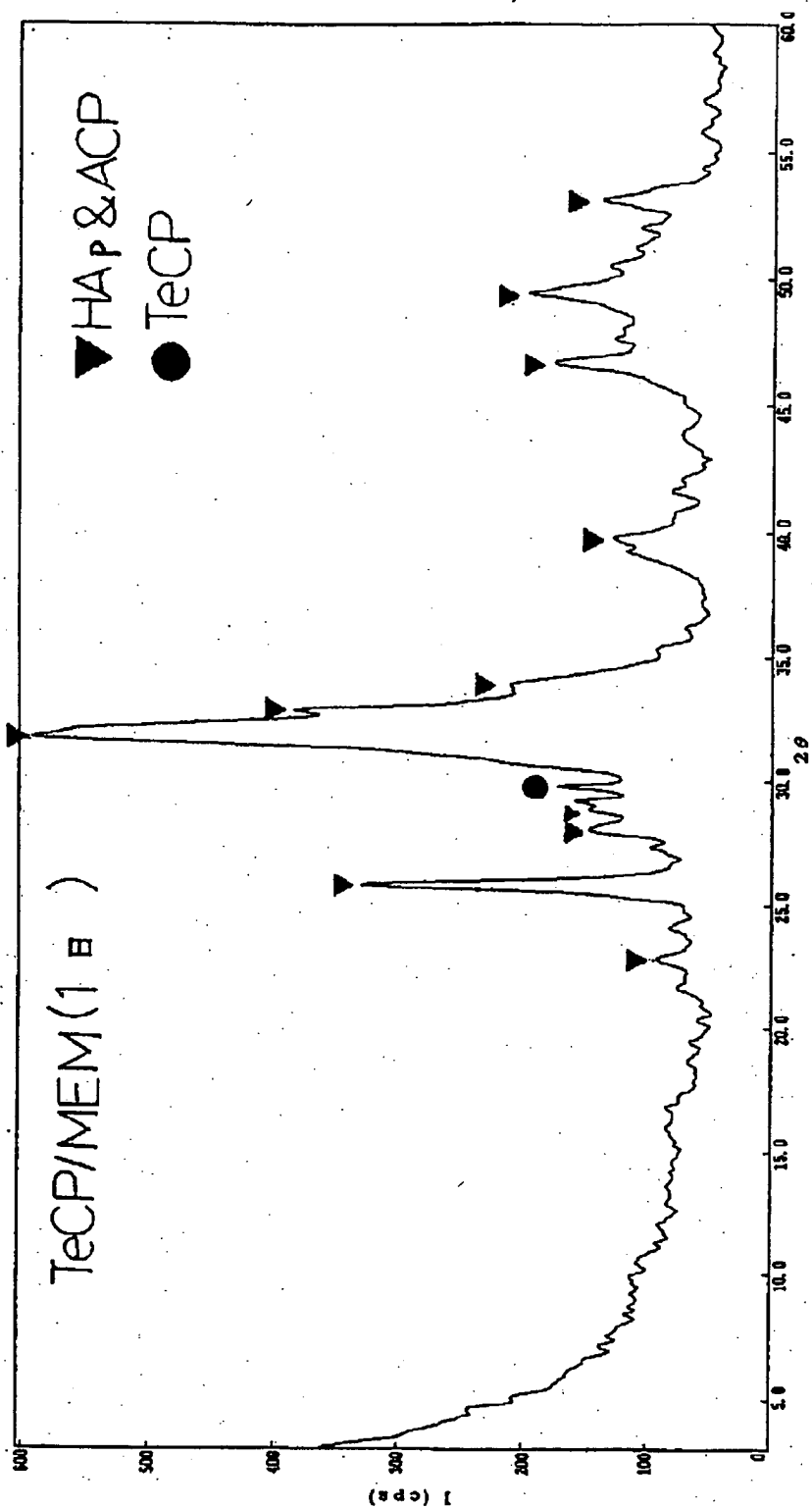
[Drawing 17]

実施例 7



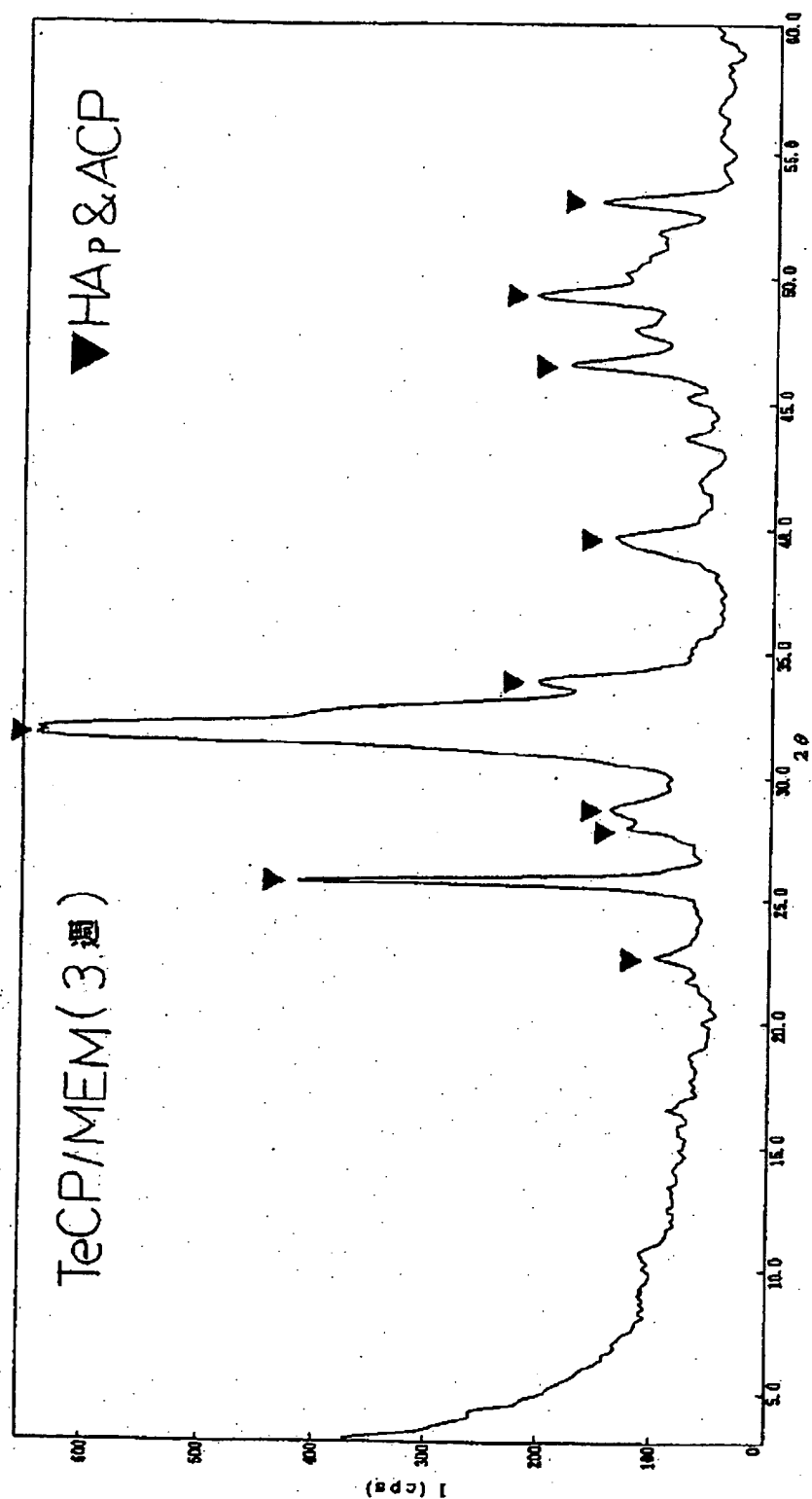
[Drawing 18]

実施例 9



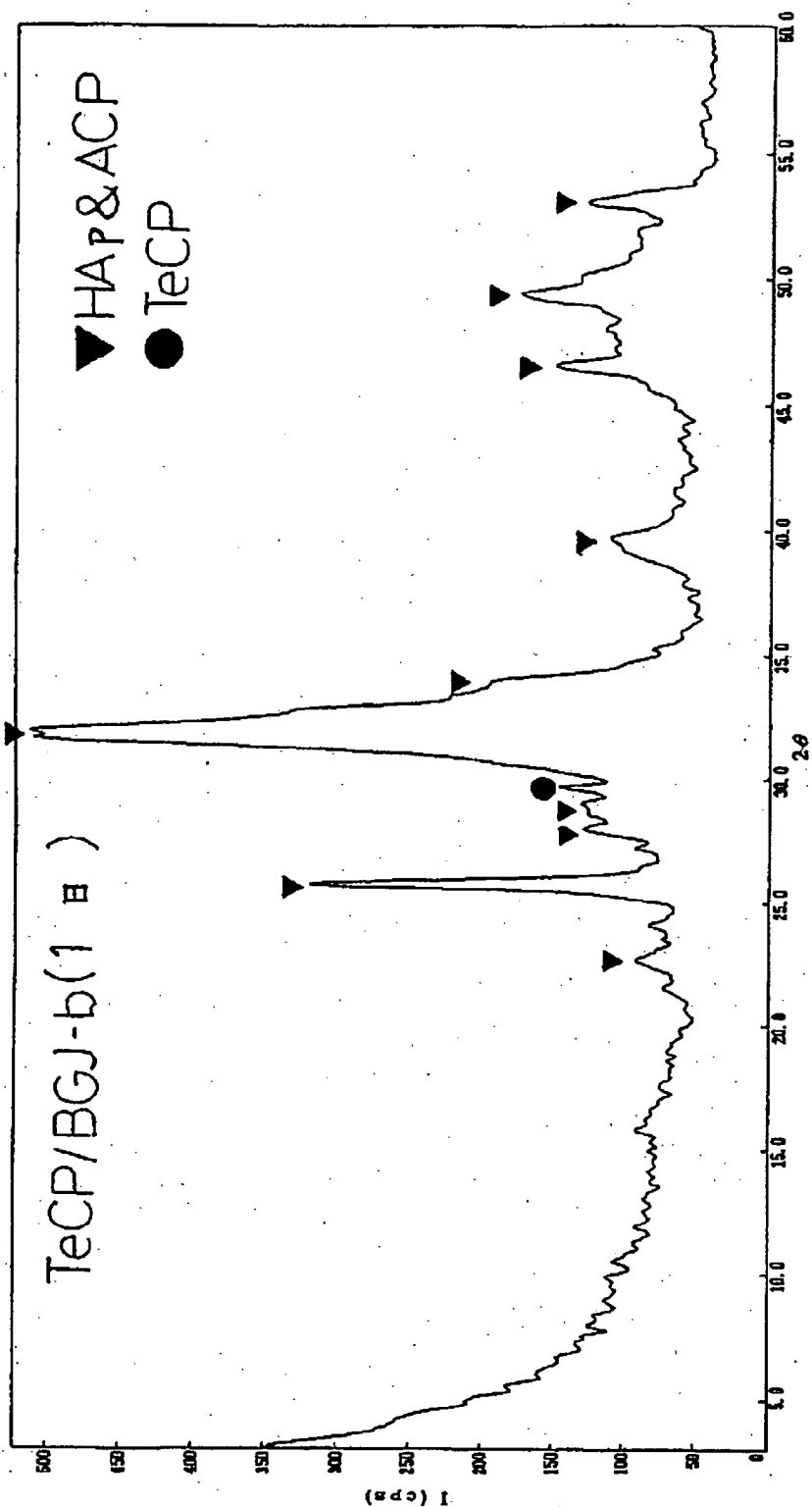
[Drawing 19]

実施例 9



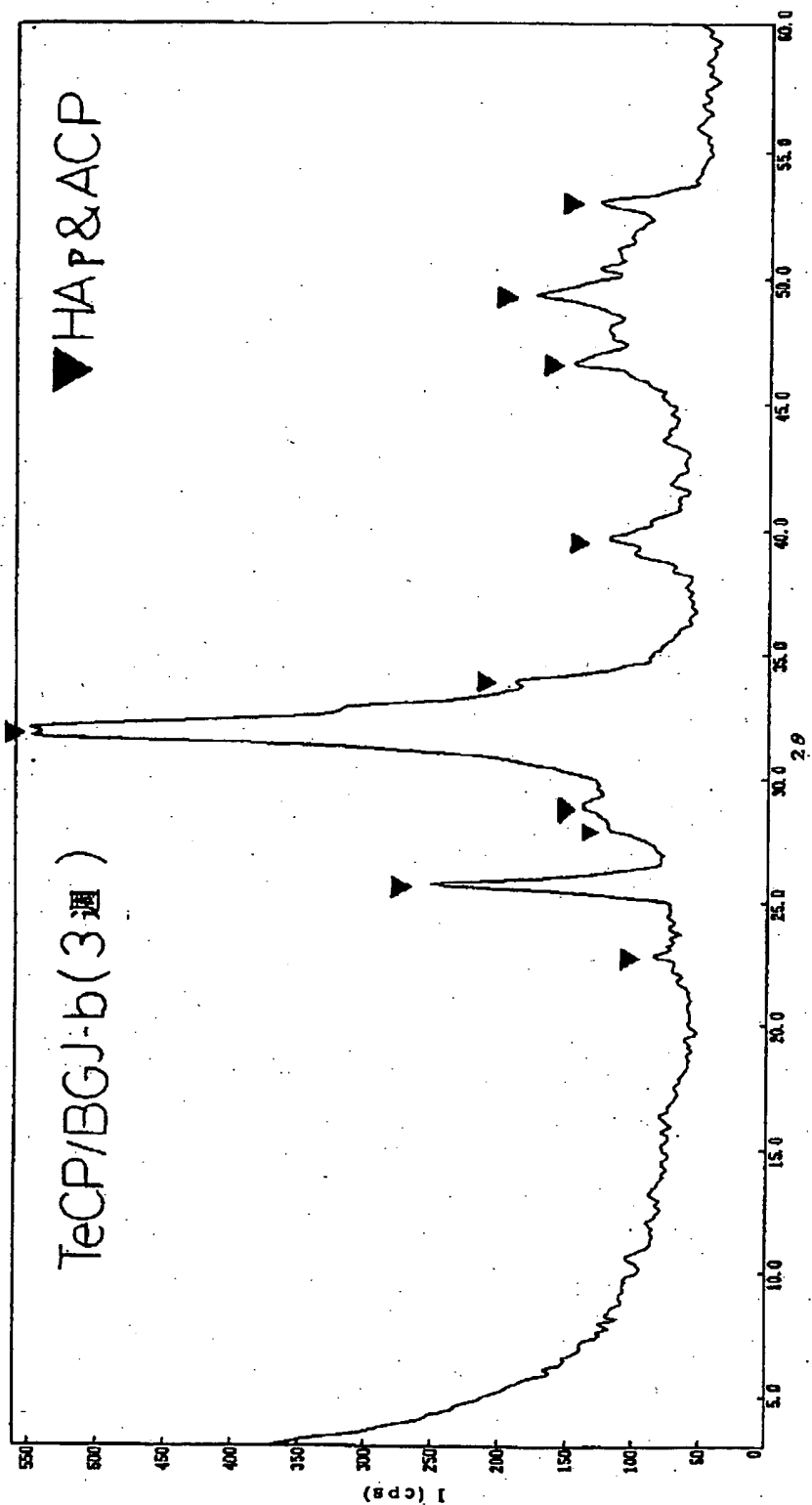
[Drawing 20]

実施例 10



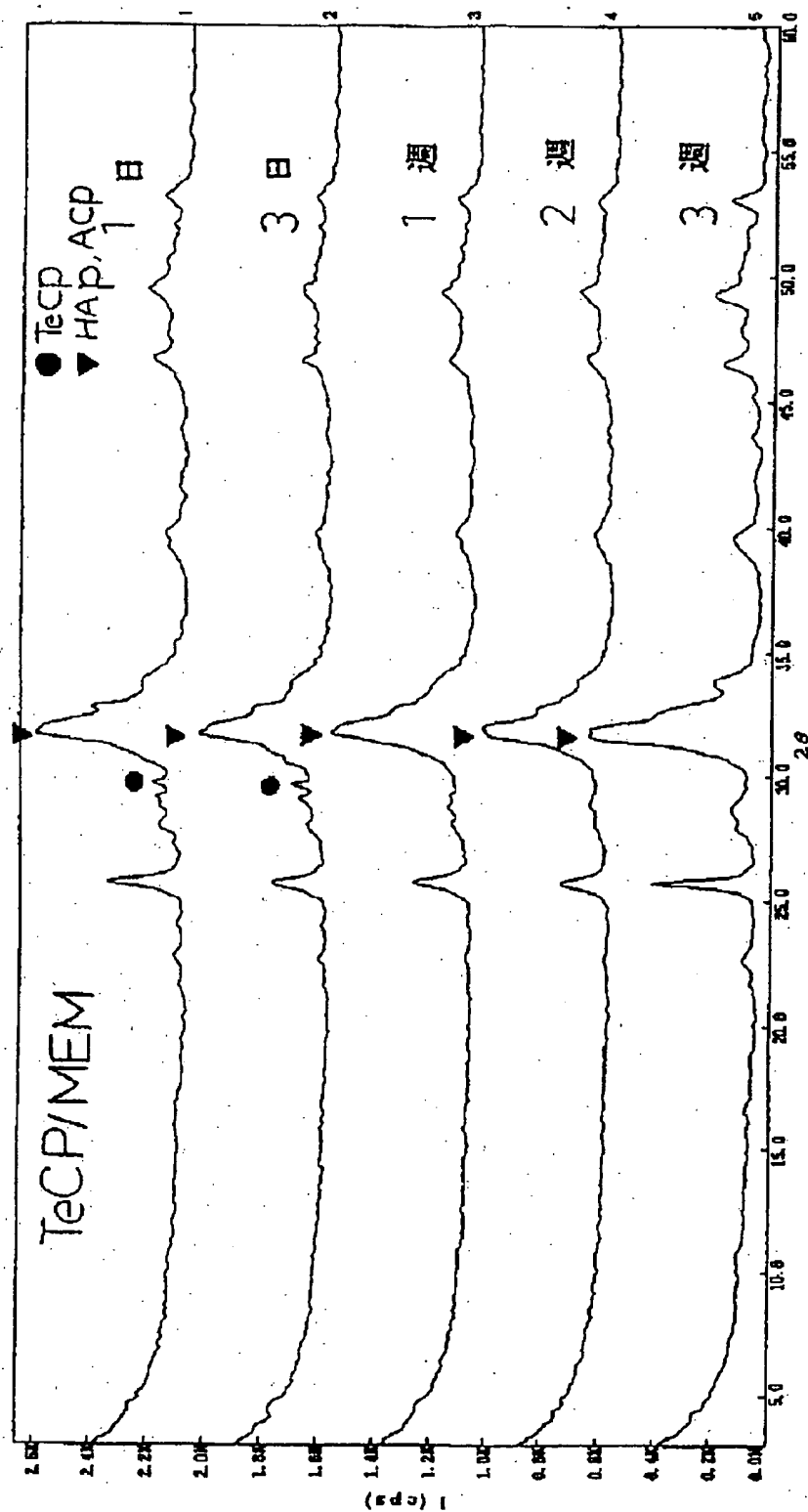
[Drawing 21]

実施例 10



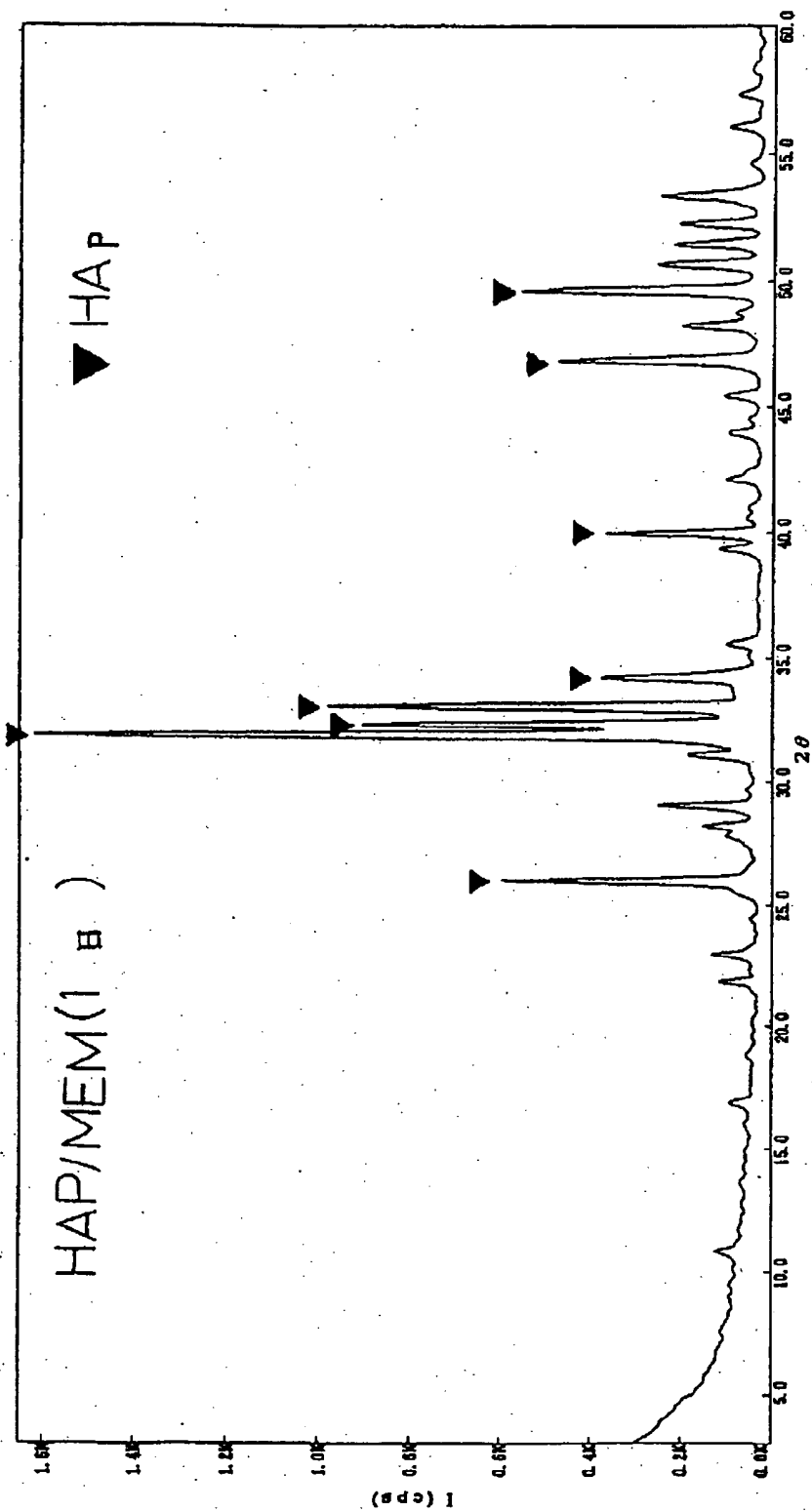
[Drawing 22]

実施例 9



[Drawing 23]

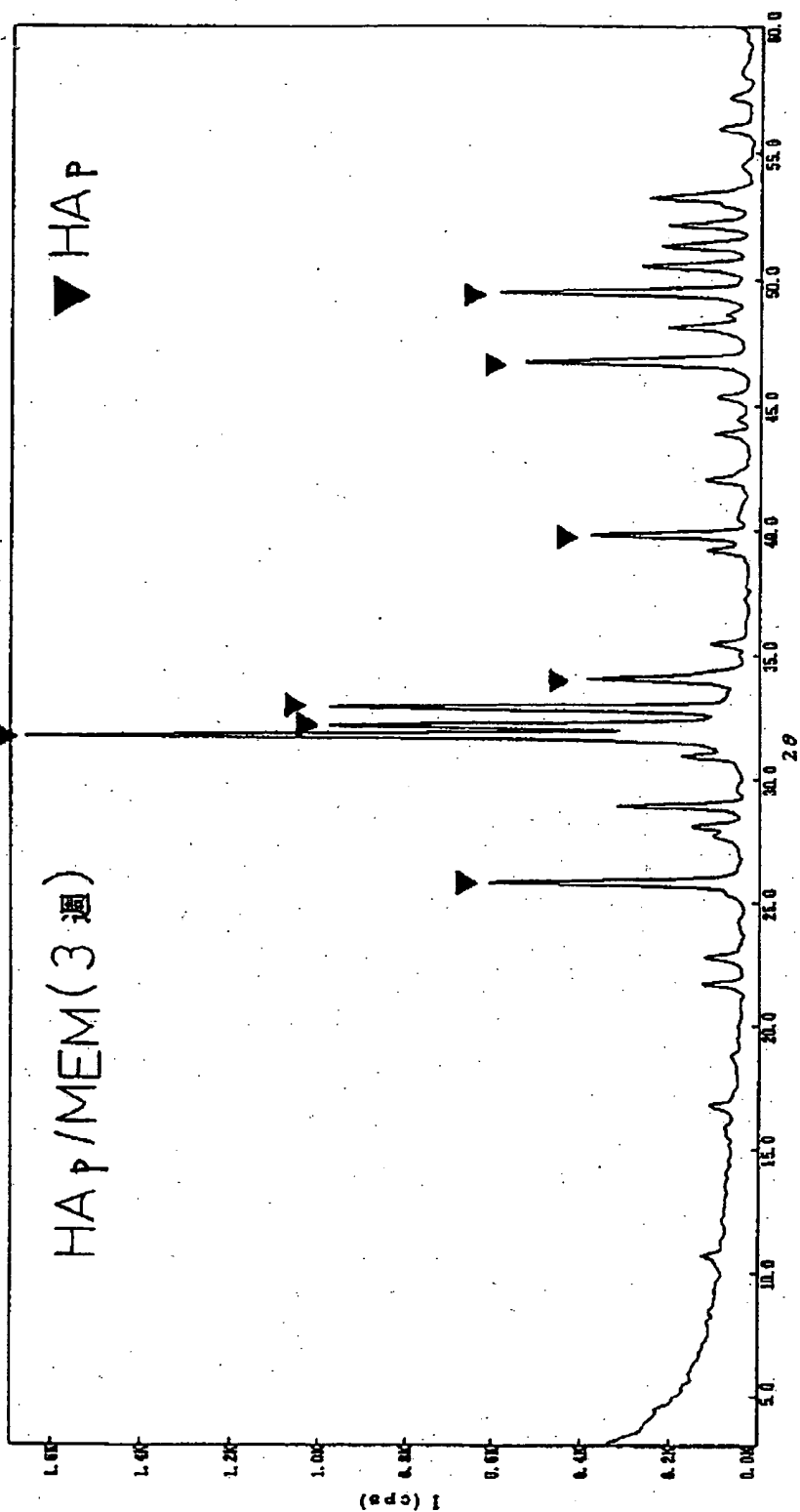
比较例 3



[Drawing 24]

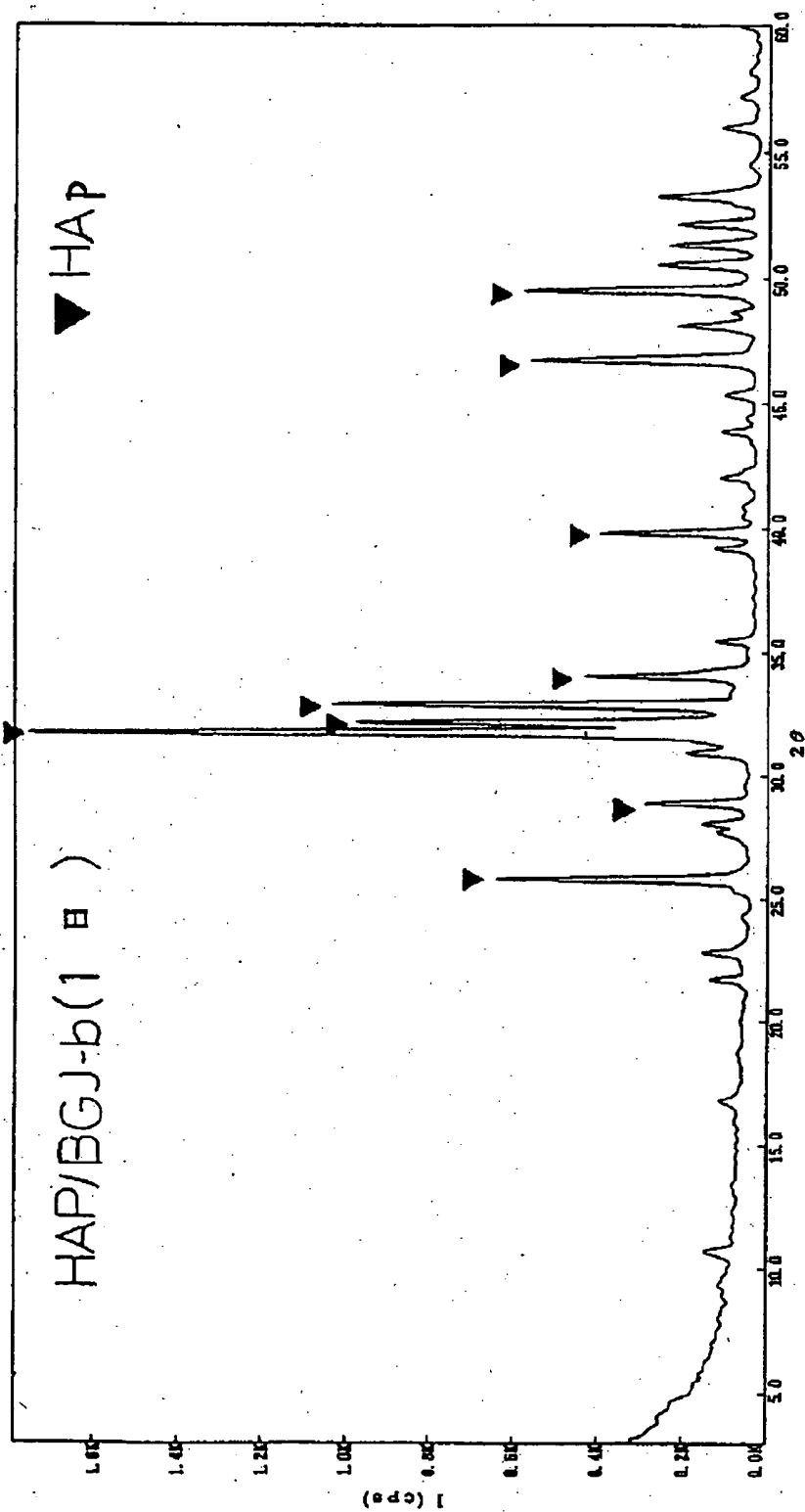
HAP/MEM(3週)

▶HAP



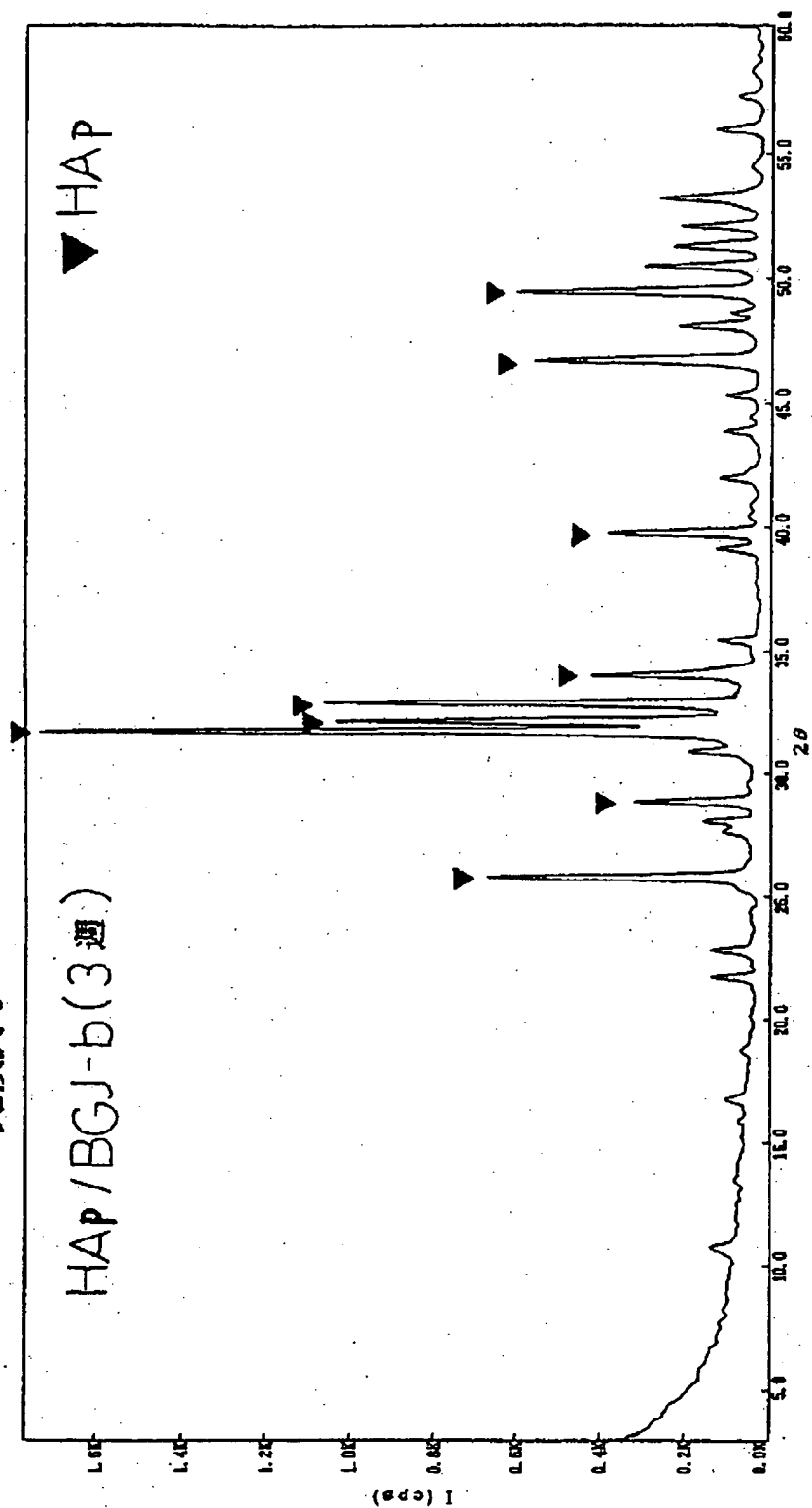
[Drawing 25]

比較例 4



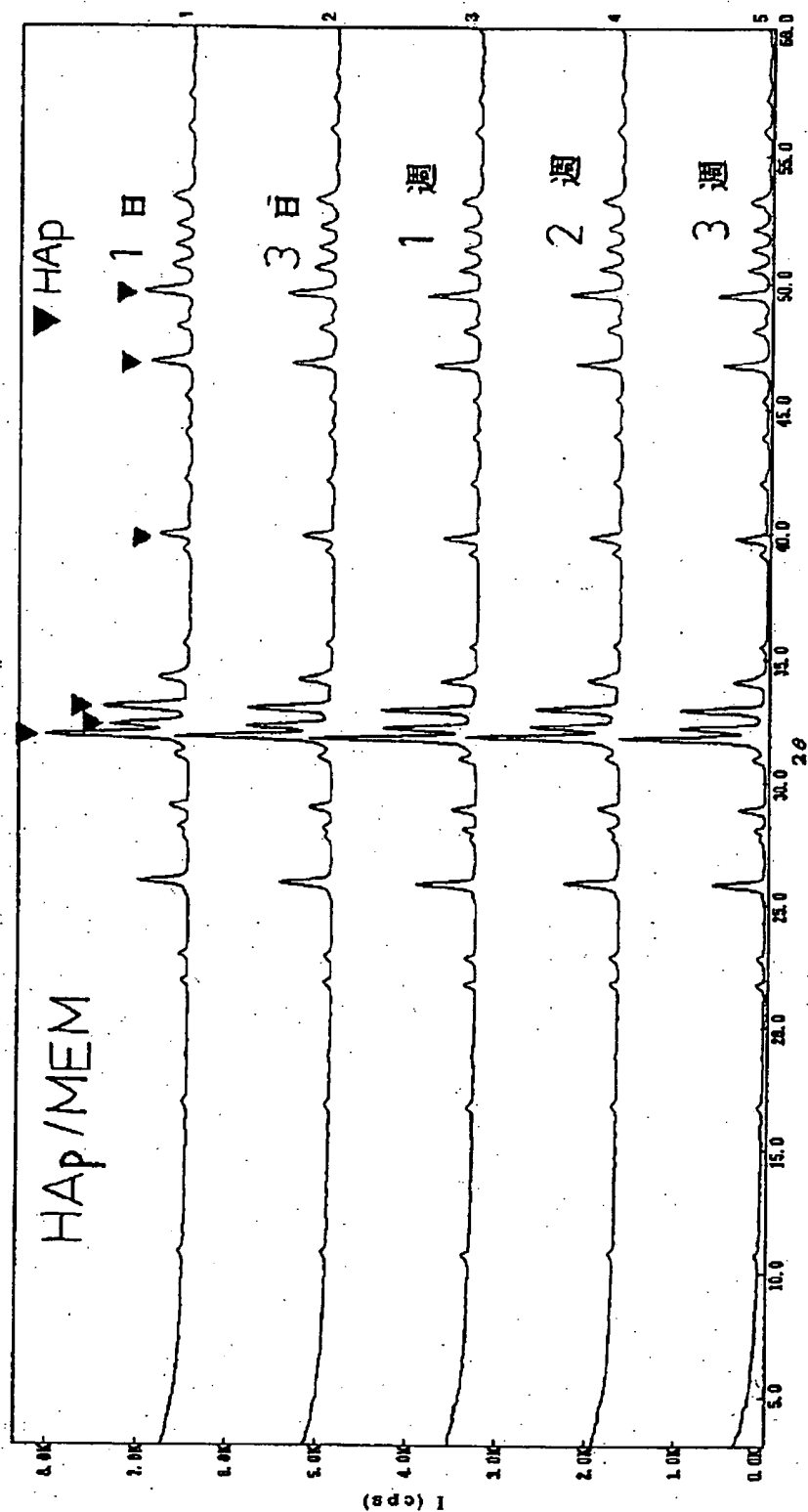
[Drawing 26]

比較例 4



[Drawing 27]

比較例 3



[Translation done.]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.